





دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین
دانشکده پزشکی

پایان نامه

جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی

عنوان:

بررسی فراوانی ژن های کد کننده آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (AMEs)
در ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه مقاوم به این داروها جمع آوری شده از
بیماران بستری در بیمارستانهای آموزشی شهرهای قزوین و تهران

استاد راهنما: جناب آقای دکتر امیر پیمانی

استاد مشاور: جناب آقای دکتر امیر جوادی

نگارش: گلاره نصیری

شماره ثبت:

سال فراغت از تحصیل:

پروردگارا

ای مهربان ترین مهربانان سپاست می گویم و پیشانی بر خاک بندگی تو می
سایم. ای خدای قادر و ای کمال مطلق در برابر نعمتهای بی کرانت سر تعظیم
فروود می آورم. الهی یاریم ده تا دانش اندکم وسیله ای برای تجلیل از تو و
متعالی ساختن خود و دیگران باشد.

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم

که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم، چرا که
این دو وجود، پس از پروردگار، مایه هستی ام بوده اند دستم را گرفتند و راه
رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. آموزگاران که برایم
زندگی، بودن و انسان بودن را معنا کردند.

همسر مهربانم

به پاس قدر دانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که محیطی سرشار از امنیت
و آرامش را برایم فراهم آورده است.

با تقدیر و تشکر از:

اساتید گرامی

جناب آقای دکتر امیر پیمانی

که با راهنماییهای بی شائبه خود مرا در انجام این پایان نامه یاری نمودند. امیدوارم توفیقی حاصل شود تا بتوانم محبتهای بی دریغ ایشان را پاسخ گویم.

جناب آقای دکتر تقی ناصرپور

که از خداوند سبحان توفیق روزافزون ایشان را خواهانم.

سرکار خانم دکتر معصومه اصلانی مهر

که همیشه مدیون زحمات و محبت های بی دریغ ایشان هستم.

و با تشکر از:

اساتید محترم گروه

سرکار خانم فتوحی

جناب آقای موسوی

و

پرسنل محترم و زحمتکش گروه میکروب شناسی

با تشکر فراوان از:

دوستان پرتلاشی که همچون ستارگان درخشان مسیر پر پیچ و خم کار پایان نامه را برای روشن ساختن، دستهایشان را به گرمی می فشارم و همیشه و در همه حال به یادشان هستم.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده فارسی	۱
فصل اول: مقدمه و کلیات	۳
۱-۱ معرفی و بیان مسئله	۴
۱-۱-۱ خصوصیات عمومی جنس کلبسیلا	۴
۱-۱-۲ کلبسیلا پنومونیه	۵
۲-۱ تاریخچه	۷
۳-۱ طبقه بندی	۷
۴-۱ بیماریزائی و اهمیت بالینی	۸
۵-۱ فاکتورهای بیماریزائی	۱۱
۱-۵-۱ آنتی ژن کپسولی	۱۱
۱-۵-۱-۱ انواع آنتی ژنهای کپسولی	۱۳
۲-۵-۱ آدهزین ها	۱۴
۳-۵-۱ لیپوپلی ساکارید	۱۵
۴-۵-۱ سیدروفورها	۱۶
۵-۵-۱ توکسین	۱۶
۶-۱ روش های تایپینگ کلبسیلا پنومونیه	۱۷
۱-۶-۱ فنو تایپینگ	۱۷
۱-۶-۱-۱ بیو تایپینگ	۱۸
۲-۶-۱-۱ سرو تایپینگ	۱۸
۳-۶-۱-۱ باکتریوسین تایپینگ	۱۹
۴-۶-۱-۱ فاز تایپینگ	۲۰
۵-۶-۱-۱ آنتی بیوگرام	۲۰

۲۰.....	۱-۶-۲ ژنوتیپینگ.....
۲۱.....	۱-۶-۲-۱ انواع روشهای ژنوتیپینگ از نظر هدف آن.....
۲۳.....	۱-۶-۲-۲ انواع روشهای ژنوتیپینگ از نظر انجام کار.....
۲۴.....	۱-۶-۲-۳ توالیابی کامل ژنوم.....
۲۴.....	۱-۶-۲-۴ هدف قرار دادن توالیهای تکراری ژنوم.....
۲۵.....	۱-۶-۲-۵ توالیابی مستقیم یک یا چند منطقه ژنتیکی.....
۲۵.....	۱-۷ عوامل ضد میکروبی.....
۲۵.....	۱-۷-۱ تاریخچه.....
۲۷.....	۱-۷-۲ عوامل ضد میکروبی.....
۲۹.....	۱-۸ آمینوگلیکوزیدها.....
۲۹.....	۱-۸-۱ کشف آمینوگلیکوزیدها.....
۲۹.....	۱-۸-۲ طبقه بندی آمینوگلیکوزیدها.....
۳۲.....	۱-۸-۳ ویژگی های آنتی باکتریال و توکسیسیتی آمینوگلیکوزیدها.....
۳۴.....	۱-۸-۴ مکانیسم عملکرد آمینوگلیکوزیدها.....
۳۴.....	۱-۸-۴-۱ برداشت آمینوگلیکوزیدها توسط باکتری.....
۳۵.....	۱-۸-۴-۲ مکانیسم عملکرد مولکولی.....
۳۷.....	۱-۹ مقاومت آنتی بیوتیکی.....
۳۹.....	۱-۹-۱ انتقال افقی ژن ها.....
۴۰.....	۱-۹-۱-۱ ترانسفورماسیون.....
۴۱.....	۱-۹-۱-۲ کانژوگاسیون.....
۴۲.....	۱-۹-۱-۳ ترانسداکشن.....
۴۳.....	۱-۹-۱-۴ پلاسمیدها.....
۴۴.....	۱-۹-۱-۵ ترانسپوزون ها.....
۴۵.....	۱-۹-۱-۶ ایتگرون ها.....
۴۵.....	۱-۱۰ مقاومت به آمینوگلیکوزیدها.....
۴۶.....	۱-۱۰-۱ ایجاد مقاومت با تغییر جایگاه هدف.....

۴۷.....	۲-۱۰-۱ ایجاد مقاومت بوسیله کاهش جذب و افزایش پمپ افلاکس
۴۸.....	۳-۱۰-۱ آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (AMEs)
۵۰.....	۱-۳-۱۰-۱ آمینوگلیکوزید N-استیل ترانسفرازها (AACs)
۵۱.....	۲-۳-۱۰-۱ آمینوگلیکوزید O-نوکلئوتیدیل ترانسفرازها (ANTs)
۵۳.....	۳-۳-۱۰-۱ آمینوگلیکوزید O-فسفو ترانسفرازها (APHs)
۵۵.....	فصل دوم: اهداف و فرضیات
۵۶.....	۱-۲ هدف اصلی
۵۶.....	۲-۲ اهداف اختصاصی
۵۶.....	۳-۲ اهداف کاربردی
۵۷.....	۴-۲ فرضیه ها یا سؤال های پژوهش
۵۸.....	فصل سوم: بررسی متون
۶۲.....	فصل چهارم: مواد و روش ها
۶۳.....	۱-۴ جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری
۶۴.....	۱-۱-۴ جمع آوری نمونه
۶۵.....	۲-۴ آزمایش های تشخیصی فنوتیپی
۶۸.....	۱-۲-۴ ذخیره سازی سویه های کلبسیلا پنومونیه
۶۸.....	۲-۲-۴ بررسی فنوتیپی حضور ژن های مقاومت در ایزوله ها
۷۵.....	۳-۴ جداسازی مجموعه ژن های <i>aac(3)-II, aac(6')-Ib, ant(4')-IIb, ant(2'')-Ia, aac(3)-Ia</i>
۷۵.....	۱-۳-۴ مراحل انجام آزمون ملکولی
۷۶.....	۱-۱-۳-۴ استخراج DNA
۷۸.....	۲-۱-۳-۴ آماده سازی پرایمر ها
۷۹.....	۳-۱-۳-۴ انجام آزمون PCR
۸۲.....	۴-۱-۳-۴ الکتروفورز محصولات PCR
۸۵.....	۴-۴ ERIC-PCR
۸۶.....	فصل پنجم: نتایج و یافته ها

۱-۵	ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به تفکیک شهر و بیمارستان	۸۷
۲-۵	بررسی فنوتیپی وجود ایزوله های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها	۸۹
۱-۲-۵	تست غربالگری آنتی بیوتیکی	۸۹
۳-۵	نتایج جداسازی ژن های AME	۹۵
۴-۵	یافته های آزمون مولکولی	۹۷
۵-۵	ERIC-PCR یافته های	۹۹
۱۰۱	فصل ششم: بحث و پیشنهادات	
۱-۶	بحث	۱۰۲
۲-۶	نتیجه گیری	۱۰۶
۳-۶	پیشنهادهای	۱۰۷
۱۰۸	فهرست منابع	
۱۲۰	ضمیمه	
۱۲۲	چکیده انگلیسی	
صفحه	فهرست جداول	
۶	جدول ۱: خصوصیات بیوشیمیایی گونه های شایع جنس کلبسیلا	
۸	جدول ۲: طبقه بندی باکتری کلبسیلا	
۲۸	جدول ۳: مکانیسم عمل عوامل ضد میکروبی	
۲۹	جدول ۴: منشا و تاریخ ساخت آمینوگلیکوزیدها	
۴۸	جدول ۵: آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها مورد مطالعه حاضر	
۶۴	جدول ۶-جدول متغیرها	
۷۱	جدول ۷-ترکیب مواد برای تهیه لوله های استاندارد نیم مک فارلند	
۷۲	جدول ۸-مشخصات کلی آنتی بیوتیک های استفاده شده در این مطالعه و معیارهای بررسی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی بر اساس CLSI (۲۰۱۳)	
۷۵	جدول ۹: تفسیر نتایج MIC جنتامایسین	
۷۶	جدول ۱۰: پرایمرهای مورد استفاده در آزمون PCR جهت جداسازی ژن های آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (AMEs)	

جدول ۱۱: مقادیر بهینه برای تهیه Mastermix واکنش PCR.....	۸۰
جدول ۱۲: مواد ملکولی مورد نیاز جهت انجام یک واکنش PCR.....	۸۱
جدول ۱۳: شرایط برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر درواکنش PCR برای ژن های مورد نظر.....	۸۱
جدول ۱۴: پرایمرهای بکار رفته جهت انجام ERIC-PCR.....	۸۵
جدول ۱۵: برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت انجام ERIC-PCR.....	۸۵
جدول ۱۶: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به تفکیک شهرهای مورد مطالعه.....	۸۸
جدول ۱۷: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به تفکیک بیمارستان های شهر قزوین.....	۸۸
جدول ۱۸: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به تفکیک بیمارستان های شهر تهران.....	۸۹
جدول ۱۹: میزان مقاومت ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به آنتی بیوتیک های مرحله غربالگری.....	۹۱
جدول ۲۰: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیر حساس به آمینوگلیکوزید به تفکیک شهر.....	۹۱
جدول ۲۱: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیر حساس به آمینوگلیکوزید به تفکیک بیمارستان های شهرقزوین.....	۹۲
جدول ۲۲: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیر حساس به آمینوگلیکوزید به تفکیک بیمارستان های شهر تهران.....	۹۲
جدول ۲۳: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیر حساس به آمینوگلیکوزید به تفکیک نوع نمونه.....	۹۳
جدول ۲۴: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیر حساس به آمینوگلیکوزید به تفکیک بخش های مختلف بیمارستانی.....	۹۳
جدول ۲۵: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیر حساس به آمینوگلیکوزید به تفکیک جنس.....	۹۴
جدول ۲۶: نتایج MIC برای ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیر حساس به جنتامایسین.....	۹۴
جدول ۲۷: فراوانی ژن های آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (AMES) در مطالعه حاضر.....	۹۶
جدول ۲۸: فراوانی ژن های <i>aac(6')-Ib</i> و <i>aac(3)-II</i> در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیر حساس به آمینوگلیکوزید جدا شده از بخش های مختلف بیمارستان.....	۹۶
جدول ۲۹: فراوانی ژن های <i>aac(6')-Ib</i> و <i>aac(3)-II</i> در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیر حساس به آمینوگلیکوزید جدا شده از نمونه های مختلف بیمارستانی.....	۹۷
جدول ۳۰: توزیع فراوانی ژن های <i>aac(6')-Ib</i> و <i>aac(3)-II</i> در کلون های مختلف.....	۹۹

فهرست اشکال..... صفحه

شکل ۱: کلنی های موکوتیدی و تخمیر کننده لاکتوز بر روی محیط مک کانگی آگار کلبسیلا پنومونیه.....	۶
شکل ۲: تاریخ کشف آنتی بیوتیک ها.....	۲۷
شکل ۳: ساختار شیمیایی استریتومایسین (از چپ به راست): استرپتیدین، استرپتوز، و گلوکزآمین.....	۳۰

- شکل ۴: ساختار شیمیایی کانامایسین دارای داکسی استریتامین به عنوان هسته آمینوسیکلیتول. گلوکز آمین به موقعیت ۴ و هگزوز به موقعیت ۶ متصل است. ۳۱.....
- شکل ۵: ساختار شیمیایی جتتامایسین C_1 , C_{1a} و C_2 ۳۲.....
- شکل ۶: سنتز پروتئین..... ۳۶.....
- شکل ۷: ترانسفورماسیون، کانژوگاسیون و ترانسداکشن..... ۳۹.....
- شکل ۸: مکانیسم های مختلف باکتریایی برای ایجاد مقاومت علیه آمینوگلیکوزیدها..... ۴۵.....
- شکل ۹: 16srRNA متیلاز بوسیله متیلاسیون جایگاه A در 16srRNA باعث مقاومت به آمینوگلیکوزیدها از طریق تغییر جایگاه هدف می شود. ۴۷.....
- شکل ۱۰: جایگاه های ایجاد تغییرات توسط AAC, ANT و APH در آمینوگلیکوزیدها..... ۴۹.....
- شکل ۱۱: دستگاه میکروسانتیفریژ مورد استفاده در مطالعه حاضر..... ۷۸.....
- شکل ۱۲: دستگاه ترموسایکلر Applied biosystems (ساخت کشور امریکا) استفاده شده در مطالعه حاضر..... ۸۲.....
- شکل ۱۳: تانک الکتروفورز مورد استفاده در مطالعه حاضر..... ۸۴.....
- شکل ۱۴: دستگاه Gel-Documentation مورد استفاده در مطالعه حاضر..... ۸۴.....
- شکل ۱۵: نتیجه تست های بیوشیمیایی انجام شده در مطالعه حاضر..... ۸۷.....
- شکل ۱۶: نتایج بدست آمده از ارزیابی فنوتیپی مقاومت به آنتی بیوتیک ها به روش دیسک دیفیوژن آگار..... ۹۰.....
- شکل ۱۷: نتایج MIC برای ایزوله های غیر حساس به جتتامایسین..... ۹۵.....
- شکل ۱۸- نتایج ژل الکتروفورز ژن *aac(6')-Ib*..... ۹۸.....
- شکل ۱۹- نتایج ژل الکتروفورز ژن *aac(3)-II*..... ۹۸.....
- شکل ۲۰- نتایج ژل الکتروفورز ERIC-PCR..... ۹۹.....

چکیده

بررسی فراوانی ژن های کد کننده آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (AMES) در ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه

مقاوم به این داروها جمع آوری شده از بیماران بستری در بیمارستانهای آموزشی شهرهای قزوین و تهران

امیر پیمانی^۱، گلاره نصیری^۲

۱- دانشیار گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، ایران

*نویسنده مسئول: قزوین، بلوار شهید باهنر، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - دانشکده پزشکی - ساختمان علوم پایه - گروه میکروب شناسی

آدرس پست الکترونیک: a.peymani@gmail.com

مقدمه: کلبسیلا پنومونیه (K. پنومونیه) یکی از شایع ترین علل عفونت مانند ذات الریه، عفونت های دستگاه ادراری، سپتی سمی و عفونت زخم است. آمینوگلیکوزیدها یک گروه از آنتی بیوتیک ها هستند که به طور گسترده در درمان عفونت های ناشی از باکتری های گرم منفی مورد استفاده قرار می گیرند. آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها منجر به مقاومت در سطح بالا در برابر آمینوگلیکوزیدها به ویژه در میان باکتری های بیماریزای گرم منفی از جمله کلبسیلا پنومونیه می شوند.

اهداف: این مطالعه با هدف تعیین فراوانی ژن های کدکننده آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (AMES) در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه های بالینی با روش PCR، و ارزیابی روابط ژنتیکی بین ایزوله ها با روش enterobacterial PCR repetitive intergenic consensus (ERIC) انجام گرفته است.

مواد و روش ها: در مجموع ۲۶۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه از بیمارستان های قزوین و تهران، جمع آوری شد. شناسایی ایزوله ها با روش های آزمایشگاهی استاندارد انجام شد. آزمون حساسیت آمینوگلیکوزیدها به روش کربی بائر برای غربالگری سویه های مقاوم با آمینوگلیکوزیدها با توجه به دستورالعمل CLSI انجام شد. آزمون تعیین حداقل غلظت مهاري (MIC) برای آنتی بیوتیک جنتامایسین با استفاده از روش رقت در آگار انجام شد. از روش PCR برای تشخیص حضور ژن های کدکننده آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (*aac(6')-Ib*, *aac(3)-II*, *aac(3)-Ia*, *ant(2'')-Ia*, *ant(4')-IIb*)، با استفاده از پرایمرهای ویژه و کنترل مثبت استفاده شد. تمام ایزوله های مثبت از نظر حضور ژن های کدکننده آنزیم های کدکننده آمینوگلیکوزیدها (AMES) برای بررسی کلونالیتیه توسط ERIC-PCR استفاده شدند.

یافته ها: ۱۷۲ (۶۴/۶٪) از ۲۶۶ کلبسیلا پنومونیه جدا شده، غیر حساس به ترکیبات آمینوگلیکوزید بودند، از این میان ۱۷۹ (۷۰/۵٪) و ۸۲ (۳۲/۲٪) ایزوله به ترتیب بالاترین و پایین ترین میزان مقاومت را در برابر کانامایسین و آمیکاسین نشان داد. نتایج MIC میزان بالایی از مقاومت (۸۸٪) برای جنتامایسین را نشان داد. از میان تمام ۱۷۲ ایزوله غیر حساس به آمینوگلیکوزیدها، ۱۵۹ (۹۲٪) ایزوله از نظر حضور ژن *aac(6')-Ib* و ۱۳۷ (۸۰٪) ایزوله از نظر حضور ژن *aac(3)-II* (به تنهایی و یا هر دو ژن باهم) مثبت بودند. تمام ایزوله ای غیر حساس از نظر حضور ژن های *ant(4')-IIb* and *ant(2'')-Ia*, *aac(3)-Ia* منفی بودند. آزمون

ERIC-PCR نشان داد که ۵۰ درصد از گونه های مثبت، دارای الگوهای مختلف باندهای DNA بودند، در حالیکه ۵۰ درصد دیگر که در سه کلون متمایز از جمله A (26.2%), B (14%), and C (9.9%) قرار گرفتند. این یافته ها تایید کرد که بیشتر ایزوله ها ارتباط ژنتیکی نداشتند.

نتیجه گیری: نتایج ما ، نشان دهنده شیوع بالای آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (AMES) در میان سویه های بالینی کلبسیلا پنومونیه در دو استان ایران است. بنابراین، برای جلوگیری از محدودیت های بیشتر در درمان بیماران مبتلا به این عفونت ها ، استراتژی های مناسب تر و قابل اجرا در درمان و تجویز آنتی بیوتیک در سیستم بهداشت و درمان ما مورد نیاز است.

کلمات کلیدی : کلبسیلا پنومونیه، ژن های آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزید، مقاومت آنتی بیوتیکی، ERIC-PCR

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱ معرفی و بیان مسئله

۱-۱-۱ خصوصیات عمومی جنس کلبسیلا

اعضای جنس کلبسیلا مانند همه اعضای خانواده انتروباکتریاسه گرم منفی و هوازی و بی هوازی اختیاری اند. اغلب انتروباکتریاسه ها از مسیر مختلط اسیدی در محیط بی هوازی تخمیر را انجام می دهند اما اعضای جنس کلبسیلا این کار را از مسیر تخمیر بوتانیدیول انجام می دهند و چرخه هوازی تولید انرژی را مانند سایر انتروباکتریاسه ها از مسیر چرخه کربس پیش می برند. این ارگانیزم ها غیر متحرک، دارای کپسول، که کپسول در کلبسیلا بزرگ و منظم است به همین دلیل کلونی آنها بزرگ و بسیار موکوییدی است و با طولانی شدن زمان کشت تمایل به یکی شدن دارند که می تواند یکی از راههای شناسایی آنها نسبت به سایر انتروباکتریاسه ها باشد. این ارگانیزم ها باسیل هائی هستند که ۱-۳ میکرومتر قطر و ۶-۰/۶ میکرومتر طول دارند که به صورت جفت یا باسیل های تکی دیده می شوند. اکثر گونه های کلبسیلا فلور نرمال دستگاه گوارش انسان، حیوان، خاک، آب و محیطهای گیاهی هستند. اعضای جنس کلبسیلا معمولاً تست لیزین دکربوکسیلاز و سیتрат مثبت دارند و به استثنای کلبسیلا اسکروماتیس و بیشتر سوش های کلبسیلا اوزنه بقیه ارگانیزم های این جنس تخمیر کننده لاکتوز هستند. ¹TSI این باکتری به صورت تخمیر لاکتوز، سوکروز و گلوکز مثبت است یعنی بالا و پایین لوله به علت تولید اسید حاصل از تخمیر به رنگ زرد در می آید و (-) H_2S است. این باکتری ها همچنین اوره آز مثبت اند که یکی از عوامل افتراقی اعضای این جنس از گونه های کلی فرم می باشد. آدنیتول، اینوزیتول، مانیتول، سالیسیلین و همچنین اغلب لاکتوز را تخمیر می کنند. بسیاری از ایزوله های این جنس از

¹ Triple Sugar Iron Agar

تخمیر قندها گاز تولید می کنند. MR^2 منفی و VP^3 مثبت بوده اما گونه هایی از این جنس که اغلب از مجاری تنفسی جدا می گردند در بعضی مواقع واکنشهای بیوشیمیایی متفاوتی نشان می دهند و ممکن است واکنش های بیوشیمیایی دیگری داشته باشند. دامیناسیون فنیل آلانین در این ارگانیسیم ها منفی بوده به استثنای یک تعداد از این باکتری ها، اغلب فاقد ژلاتیناز می باشند. محتویات G+C در این جنس ۵۸٪-۵۲٪ و گونه شاخص در این جنس کلبسیلا پنومونیه می باشند (۱).

۱-۱-۲ کلبسیلا پنومونیه

این باکتری همانند دیگر گونه های کلبسیلا غیر متحرک و کپسول پلی ساکاریدی شاخصی را تولید می کند (شکل ۱). این ارگانیسیم ها اوره آز، لیزین دکربوکسیلاز مثبت بوده و در آزمون های اورنیتین دکربوکسیلاز، آرژنین دهیدرولاز و تولید اندول، منفی می باشند. تست VP در این گونه مثبت می باشد. این ارگانیسیم در محیط TSI به صورت اسید اسید، بدون تولید گاز سولفید هیدروژن و همچنین تولید کننده گاز می باشد (جدول ۱). در حرارت مرطوب به مدت ۳۰ دقیقه از بین می رود. در خشکی برای چندین ماه زنده می ماند و زمانیکه کشت ها در دمای اتاق نگهداری می شوند هفته ها یا ماه ها زنده می مانند. رشد این باکتری با آنکه بیهوازی اختیاری می باشد در شرایط بیهوازی مطلق ضعیف است. فاقد توانایی لیز گلبول های قرمز خون بر روی محیط بلاد آگار حاوی خون اسب و گوسفند می باشد. دمای رشد بهینه این ارگانیسیم ۳۷ درجه سانتی گراد و در دمای بین ۴ تا ۴۳ درجه سانتی گراد قابلیت رشد دارد (۲).

² Methyl Red

³ Voges Proskauer



شکل ۱: کلنی های موکوئیدی و تخمیر کننده لاکتوز بر روی محیط مک کانگی آگار کلبسیلا پنومونیه

یکی از خصوصیات منحصر به فرد در کلبسیلا پنومونیه تثبیت نیتروژن می باشد. تنها جنس در خانواده انتروباکتریاسه بوده که توانایی تثبیت نیتروژن موجود در اتمسفر هوا و تبدیل آن به آمونیاک و اسیدهای آمینه را دارد (۳). یکی دیگر از محصولات متابولیکی این باکتری 1,3-propanediol می باشد که در شرایط بی هوازی یا میکروآئروفیل تولید می کند (۴).

جدول ۱: خصوصیات بیوشیمیایی گونه های شایع جنس کلبسیلا

Test or Substrate	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>			<i>K. oxytoca</i>			<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>		
	Sign	% +	(% +)	Sign	% +	(% +)	Sign	% +	(% +)
Urease	+	95.4	(0.1)	+	90		D	0	(14.8)
Indole	—	0		+	99		—	0	
Methyl red	— or +	10		—	20		+	97.7	
Voges-Proskauer	+	98		+	96		—	0	
Citrate (Simmons)	+	98	(0.6)	+	95		D	30	(32.4)
Gelatin (22° C)	—	0	(0.2)	—	0		—	0	
Lysine decarboxylase	+	98	(0.1)	+	99		— or +	40	(6.3)
Malonate	+	92.5		+	98		—	6	
Mucate	+	90		+	93		— or +	25	
Sodium alginate (utilization)	+ or (+)	88.5	(9.2)	nd			— or (+)	0	(11)
Gas from glucose	+	96		+	97		d	50	(9.4)
Lactose	+	98.7	(1)	+	100		d	30	(61.3)
Dulcitol	— or +	30		+ or —	55		—	0	
Organic acid media									
Citrate	+ or —	64.4		nd			— or +	18	
D-Tartrate	+ or —	67.1		nd			— or +	39	

Modified from Ewing WH: *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*, ed 4, East Norwalk, Conn, 1986, Appleton and Lange.
 +, ≥90% positive within 1 or 2 days; (+), positive reaction after 3 or more days (decarboxylase tests: 3 or 4 days); —, ≥90% no reaction in 30 days; + or —, most cultures positive, some strains negative; — or +, most strains negative, some cultures positive; d, different reactions; +, (+), —, nd, no data.

۱-۲ تاریخچه

جنس کلبسیلا عضوی از تیره کلبسیله و از خانواده انتروباکتریاسه است. نام ارگانیزم از اسم Edvin Klebs میکروبیولوژیست آلمانی در قرن ۱۹ (۱۸۳۴-۱۹۱۳) گرفته شده است. *K. pneumoniae* شایع ترین گونه در بین سایر گونه های جنس کلبسیلا است. این باکتری به وسیله کارل فریدلندر از ریه بیمار مبتلا به پنومونی جدا شد و به نام باسیل فریدلندر عامل پنومونی شدید و کشنده نامیده می شود.

۱-۳ طبقه بندی

هم اکنون کلبسیلا، انتروباکتر، سراشیا، پانتوا و هافنیا جنس های موجود در تیره کلبسیلیه هستند. سابقا سه جنس کلبسیلا، انتروباکتر و سراشیا در یک گروه تحت عنوان گروه باکتریایی KES شناخته می شدند. جنس کلبسیلا شامل دو گونه بیماریزا مهم می باشد که عبارتند از: کلبسیلا پنومونیه و کلبسیلا اکسی توکا. اگرچه کلبسیلا رینواسکلروماتیس و کلبسیلا اوزنه زیرگونه های کلبسیلا پنومونیه هستند. در جدول ۲ جدیدترین طبقه بندی باکتری کلبسیلا ذکر شده است (۶). کلبسیلا اکسی توکا ابتدا از شیر جدا شد در ابتدا تحت عنوان کلبسیلا پنومونی اندول مثبت تقسیم بندی می شد ولی امروزه بیشتر به عنوان یک گروه متمایز از کلبسیلا پنومونیه طبقه بندی می شود (۷). در دهه ۱۹۸۰ چهار گونه جدید دیگر در این جنس شامل: *K. planticola* and *K. terrigena*, *K. trevisanii*, *K. ornithinolytica* به ترتیب مورد شناسائی قرار گرفتند (۸-۱۱) و بر مبنای هیبریداسیون DNA-DNA، *K. planticola* و *K. trevisanii* متعاقبا با یکدیگر ترکیب شدند و به عنوان *K. planticola* در نظر گرفته شدند (۱۲). ۳ گونه *K. planticola*, *K. terrigena*, *K. ornithinolytica* اخیرا "در جنس جدیدی در خانواده انتروباکتریاسه به نام *Raoultella* قرار گرفته اند (۱۳). ایزوله های بالینی کلبسیلا

پنومونیه بر مبنای تغییرات نوکلئوتیدی در ژنهای *gyrA*، *parC* و *rpoB* در ۴ گروه تقسیم می شوند که شامل: KP I، KP II-A، KP II-B، KP III می باشد. همچنین گونه جدیدی تحت عنوان *K. variicola* توصیف شده که در گروه KP III قرار گرفته است (۱۴).

جدول ۲: طبقه بندی باکتری کلبسیلا

Domain	Bacteria
Kingdom	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Class	Gamma proteobacteria
Order	Enterobacteriales
Family	Enterobacteriaceae
Genus	<i>Klebsiella</i>
Species	<i>pneumonia, alba, granulomatis, oxytoca, senegalensis milletis, milletis, variicola</i>

۴-۱ بیماریزائی و اهمیت بالینی

کلبسیلا پنومونیه (باسیل فریدلاندر) شایع ترین گونه بیماریزا در جنس کلبسیلا است. این ارگانیسم قبل به عنوان عامل پنومونی لوبار کلاسیک شناخته می شد اما عامل اصلی این پنومونی، استرپتوکوکوس پنومونیه می باشد. هر دو فرم پنومونی یعنی پنومونی بیمارستانی و غیر بیمارستانی را می تواند ایجاد کند. سویه هایی از

کلبسیلا پنومونیه که عامل ایجاد پنومونی هستند معمولا سروتیپ های ۱ و ۲ کپسولی می باشند. موارد ابتلا به این بیماری، در افراد در سنین میانسالی و یا بالاتر می باشد که مشکلات پزشکی زمینه ای مثل بیماری برونکوپولموناری مزمن، دیابت داشته یا الکلی می باشند. پنومونی کلبسیلا در تقریبا ۲۵ تا ۷۵ درصد از مبتلایان، خلط خونی غلیظی را تولید می کند که بوی گندیدگی ندارد. در این پنومونی احتمال تشکیل نکروز و آبسه نسبت به بقیه پنومونی های باکتریال بیشتر است و کشت خون در ۲۵ درصد از مبتلایان مثبت می باشد. گونه های کلبسیلا پنومونیه به طور مشخص نسبت به تعداد زیادی از داروها مقاوم هستند و نسبت به پنومونی استرپتوکوکی عموما بیماری شدیدتری ایجاد می نمایند. حتی با درمان مناسب میزان مرگ و میر پنومونی کلبسیلایی ۴۰ تا ۶۰ درصد می باشد. کلبسیلا پنومونیه یکی از عوامل عفونت های سیستم ادراری، عفونت های زخم، باکتری می و مننژیت است. اگرچه ممکن است عامل ایجاد پیلونفریت و سیستیت در بیماران دارای کاتتر باشد اما بندرت باعث ایجاد این عفونت ها در افراد دیگر می شود. سویه های عامل ایجاد عفونت مجاری ادراری سروتیپ های ۲۴، ۱۰، ۹، ۸ کپسولی هستند. اعضا جنس کلبسیلا دارای کپسول واضح می باشند که مسئول ایجاد ظاهر موکوئیدی در کلونی ها و افزایش بیماریزایی ارگانیزم در *in vivo* می باشد (۱۵).

شایع ترین اعضای جدا شده این جنس کلبسیلا پنومونیه و کلبسیلا اکسی توکا می باشند که سبب پنومونی لو بار اولیه اکتسابی از جامعه یا بیمارستان می گردند. پنومونی ایجاد شده توسط گونه های کلبسیلا غالبا سبب تخریب نکروتیک فضا های آلوئولی، تشکیل حفره و تولید خلط خونی کم رنگ می گردد. قابلیت این ارگانیزم در ایجاد بیماری به علت کاسته شدن دفاع میزبان در نتیجه اعمال جراحی پیچیده و طولانی و همین طور مصرف دارو های متفاوت رو به ازدیاد می باشد (۱۶و ۱۷). در انسان ها گونه های کلبسیلا بر روی پوست، حلق یا دستگاه گوارش استقرار می یابند. این باکتری در زخم های استریل، ادرار استقرار پیدا کرده و ممکن است به عنوان فلور

نرمال قسمت هایی از روده باریک و مجاری صفراوی هم در نظر گرفته شود (۱۷). انتقال کلبسیلا از یک بیمار به یک بیمار دیگر از طریق وسایل آلوده پزشکی، دست های آلوده پرسنل بیمارستان و محصولات خونی صورت می گیرد، در حالیکه مناطق ایجاد کننده عفونت توسط گونه های کلبسیلا، زخم های جراحی، پریتونئوم، مکان های ورود کاتتر، مجاری ادراری، دستگاه گوارش و مجاری صفراوی می باشد (۱۸). کلبسیلا پنومونیه عامل عفونت های مجاری ادراری، آرتریت نوزادان، مننژیت، عفونت زخم ها، پنومونی بیمارستانی، باکتری می، سپتی سمی و عفونت های بافت نرم می باشد (۱۶). پنومونی کسب شده از بیمارستان یک بیماری شدید با مرگ و میر بالا همراه با تهاجم سریع، تب بالا، خلط خونی و آبه های قابل مشاهده در رادیوگرافی قفسه سینه می باشد. میزان مرگ و میر در حدود ۲۵ تا ۵۰٪ می باشد (۱۹). همچنین کلبسیلا پنومونیه عامل سندرومی است که سپتی سمی همراه با آبه های کبدی ایجاد می کند که ۱۰ تا ۴۰٪ باعث مرگ می شود. که اولین بار در سال ۱۹۸۱ توسط کلبسیلا پنومونیه کسب شده از جامعه در تایوان گزارش شد بعضی از درگیری های مرتبط با این سندرم که به شکل مننژیت و اندوفتالمیتیس می باشد، در این سندرم مشاهده شده است (۲۰). علائم این بیماری شامل: خستگی، بی اشتها، حالت تهوع، درد منتشر شکمی، درد پلور، زردی و تب می باشد (۲۱). سروتپ K1 کپسولی سروتپ غالب کلبسیلا پنومونیه در ایجاد آبه های کبدی می باشد (۲۲). ژن *rmpA*⁴ در ارتباط با خصوصیت فنوتیپی افزایش چسبندگی ایزوله های کلبسیلا پنومونیه ایجاد کننده آبه کبدی در تایوان بوده است. رحیمیان و همکارانش مشخص کرده اند که آبه های کبدی معمولاً در بیماران با ملیت آسیایی رخ می دهد که نشان دهنده ارتباط احتمالی ژنتیکی با حساسیت به این بیماری می باشد (۲۳). وجود بیماری های زمینه ای متنوع شامل دیابت، مصرف بیش از حد الکل، بیماری های مجاری صفراوی، بدخیمی ها، سیروز کبدی، بیماری های کلیوی، عفونت های داخل شکمی، تاریخچه مصرف

⁴ Mucoviscosity Associated Gene A

استروئیدها، تاریخچه جراحی های ناحیه شکم و تاریخچه مصرف آنتی بیوتیک ها همه به عنوان فاکتورهای خطر برای عفونت آبسه کبدی ناشی از سروتیپ کپسولی K1 در کلبسیلا پنومونیه می باشد (۲۴). کلبسیلا پنومونیه به عنوان پاتوژن شایع ایجاد کننده اندوفتالمیت باکتریال با منشا داخلی مرتبط با آبسه کبدی در آسیا می باشد (۲۵). کلبسیلا پنومونیه سروتیپ کپسولی K1 توانائی ایجاد عفونت در سیستم عصبی مرکزی به عنوان عارضه ای از آبسه های کبدی چرکی در بیماران دارای بیماری های زمینه ای دارد (۲۶). کلبسیلا پنومونیه همچنین با اسهال مزمن در افراد HIV مثبت مرتبط است (۲۷).

۱-۵ فاکتورهای بیماریزائی

با بررسی مکانیسم های بیماریزایی عفونت های کلبسیلایی، تعدادی از فاکتورهای ویروالانس این باکتری شناسایی شده اند. استفاده از مدل های حیوانی، نقش مهمی در مطالعه بیماریزایی کلبسیلا داشته و از این طریق می توان اطلاعات مهمی که از مطالعات *Invitro* نمیتوان به دست آورد، را کسب نمود. بر طبق مطالعات انجام شده، ۵ فاکتور برای بیماریزایی کلبسیلا مطرح شده است.

۱-۵-۱ آنتی ژن کپسولی

کپسول پلی ساکاریدی به عنوان مهمترین فاکتور بیماریزایی کلبسیلا پنومونیه مورد شناسائی قرار گرفته است. نقش آنتی ژن های پلی ساکاریدی K به عنوان مفیدترین ابزارهای تعیین سروتیپ به اثبات رسیده است. در متممی گونه ها آنتی ژن K مشترکی شرح داده شده و در حدود ۷۵ آنتی ژن K شناسایی شده اما هیچکدام از سروتیپ ها عفونت معینی را ایجاد نکرده و نسبت به سروتیپ دیگر شیوع بیشتری ندارند. کپسول از واحدهای تکراری قندهای ۴ تا ۶ کربنه (گلوکز، گالاکتوز، مانوز، فوکوز و رامنوز) و اغلب اسیدهای ارونیک (به عنوان

ترکیبات دارای شارژ منفی) تشکیل شده است (۱۷). کپسول پلی ساکاریدی تیپ ۲ حاوی گلوکز، مانوز و N-استیل گلوکورونیک اسید می باشد (۲۸). مواد کپسولی به شکل دسته های فیبرینی در سطح پوشش باکتری به منظور محافظت باکتری از فاگوسیتوز بواسطه ماکروفاژ و جلوگیری از کشته شدن باکتری بوسیله فاکتورهای سرمی باکتریسیدال گسترده شده اند (۱۷). مطالعات آزمایشگاهی نشان می دهد که وجود کپسول پلی ساکاریدی مانع از رسوب جزء C3 کمپلمان بر سطح باکتری شده و سبب کاهش اتصال و فاگوسیتوز باکتری توسط ماکروفاژها و سلول های اپی تلایل می گردد (۲۹). سروتیپ های کپسولی K1 و K2 مقاومت سطح بالا در مقابل فاگوسیتوز بواسطه ماکروفاژها دارند. در مقابل ایزوله های فاقد این تیپ های کپسولی معمولاً^۵ مقاومت نسبت به فاگوسیتوز نداشته و بیماریزایی کمتری دارند (۳۰). آنتی ژن های K کلبسیلا توسط آزمایش تورم کپسولی^۵ با آنتی سرم اختصاصی شناسایی می شوند. عفونت های انسانی سیستم تنفسی بیشتر مربوط به تیپ های کپسولی ۱ و ۲ هستند اما عفونت های سیستم ادراری در ارتباط با تیپ های ۸، ۹، ۱۰، ۲۴ کپسولی می باشند. وجود این کپسول در سطح کلبسیلا پنومونیه ممکن است به عنوان یک سد محافظتی در مقابل پتیدهای ضدمیکروبی (Aps) مانند لیزوزیم و لاکتوفرین باشد. غلظت های تحت حد کشندگی^۶ پتیدهای ضدمیکروبی باعث افزایش رونویسی از اپرون cps می شود که در ارتباط با افزایش تولید کپسول پلی ساکاریدی در سطح باکتری می باشد (۱۵). بر طبق مطالعات انجام شده تولید کلونی های موکوئیدی به عنوان یک فاکتور اصلی برای تثبیت بیماریزایی در این سویه ها شناخته شده است. ژن مربوط به تولید این کلونی های موکوئیدی توسط پلاسمید کد شده و به کپسول پلی ساکاریدی و کلونیک اسید هم مربوط نمی شود (۳۱). رسپتورهای مانوز بر روی سطح ماکروفاژ، توالی های مانند Man-α 2/3 Man و همچنین Rah-α 2/3 Rah را بر روی سطح

⁵ Quellung Reaction

⁶ sub-lethal

کپسول تعدادی از سروتیپ های کپسولی تشخیص می دهند. بنابراین بخش عمده ای از حذف سریع برخی از سروتیپ های کپسولی در مجاری تنفسی ممکن است بخاطر تشخیص مستقیم ارگاناسم توسط فاگوسیتوز وابسته به رسپتور های مانوزی باشد (۳۲). کپسول ارگاناسم را قادر می سازد تا در مقابل فاگوسیتوز و قدرت کشندگی سرم طبیعی مقاومت نماید. فرضیه مقاومت سرمی هم که برای کلبسیلا مطرح می شود به این صورت می باشد (۳۳-۳۶):

الف) کپسول پلی ساکاریدی می تواند روی LPS را پوشانده و ساختمان سطحی را بوجود آورد که مانع فعالیت کمپلمان گردد.

ب) ممکن است زنجیره جانبی O لیپو پلی ساکارید، از میان لایه کپسولی بیرون آمده و در معرض محیط خارجی قرار گیرد و با توجه به اینکه LPS معمولاً قادر به فعال ساختن کمپلمان است، در نتیجه C₃b بر سطح مولکول های LPS رسوب می نماید و از تشکیل کمپلکس کشنده حمله به غشا (C₅b-C₉) و در نهایت از آسیب به غشا و مرگ سلولی جلوگیری به عمل خواهد آمد (۳۳-۳۶).

در نهایت Edvard در سال ۲۰۱۰ بیان کرد که کلبسیلا پنومونیه تولید کننده کپسول بواسطه ممانعت از اتصال و بلعیدن باکتری ها سبب نقص در پاسخ ایمنی شامل بلوغ دندرتیک سل ها و تولید سایتوکین های سلول های Th1 می شود (۳۷).

۱-۵-۱ انواع آنتی ژنهای کپسولی

تیپ های کپسولی K1، K2، K4 و K5 دارای ویروالانس بیشتری در عفونت های تجربی در موش می باشند. همچنین اغلب عفونت های شدید کلبسیلا پنومونیه در نمونه های انسانی و حیوانی در ارتباط با این سروتیپ

های کپسولی می باشد. ایزوله های K1 در نمونه های پنومونی فرید لاندر و همچنین آبسه های کبدی، فراوان ترین تیپ کپسولی هستند که جدا می شوند. تیپ ۳ کپسولی نیز همیشه در ارتباط با نمونه های رینو اسکروما گزارش می شود (۳۸). تیپ ۴ و بندرت تیپ ۵ کپسولی در ارتباط با نمونه های رینیت آتروپیک ایجاد شده توسط سویه های کلبسیلا پنومونیه زیر گونه اوزونه می باشند (۳۸). در میان تمام سرو تیپ ها، سرو تیپ های کپسولی K1 و K2 در سویه های کلبسیلا پنومونیه به عنوان غالب ترین سرو تیپ های بیماریزا به خصوص در ایجاد آبسه های کبدی و اندوفتالمیت گزارش می شوند. از جمله ترکیباتی که سبب کاهش تولید کپسول در سویه های کلبسیلا پنومونیه می شود، می توان به بیسموت و سالیسیلات اشاره کرد. این ترکیبات به دنبال کاهش تولید کپسول در این سویه ها، جذب فاگوسیتی باکتری را هم افزایش می دهند. تاثیر این ترکیبات بر روی کپسول کلبسیلا پنومونیه به عنوان اولین فاکتور بیماریزا در این باکتری ها، می تواند بیانگر پتانسیل عملکردی این ترکیبات به صورت دارو باشد (۳۱).

۱-۵-۲ ادھزین ها

اتصال به لایه های مخاطی و سلول های اپی تلیال اغلب اولین مرحله برای گسترش و استقرار عفونت می باشد. ادھزین ها اغلب دارای خاصیت هماگلوتیناسیون هستند. آنها را بر اساس اینکه آیا واکنش اتصالشان به سلول میزبان با حضور D-مانوز مهار می شود یا خیر، به دو گروه حساس به مانوز و مقاوم به مانوز تقسیم می شوند. بیش از ۸۰٪ از ایزوله های کلبسیلا پنومونیه فیمبریه نوع ۱ را بیان می کنند (۳۹). این نوع پیلی هماگلوتینین حساس به مانوز بوده و گلبول های خوکچه هندی را آگلوتینه می نماید. ایزوله های کلبسیلا پنومونیه معمولاً سه نوع پیلی تولید می کنند که شامل پیلی نوع ۱، ۳ و ۶ می باشد. مطالعات نشان می دهد که پیلی نوع ۱ فاکتور بیماریزای مهمی در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه ایجاد کننده عفونت ادراری، پیلونفریت و

پنومونی می باشد زیرا باعث اتصال باکتری به سلول های مخاطی و یا اپیتلیال مجاری ادراری-تناسلی و گوارشی می شود (۳۱، ۴۰، ۴۱). همچنین معتقدند که پیلی نوع ۳ در تشکیل ساختارهایی تحت عنوان بیوفیلم شرکت می کند. بیوفیلم ساختاری است که سبب مقاومت باکتری در مقابل مکانیسم های دفاعی میزبان و اثرات آنتی بیوتیک ها می شود (۴۲). این نوع پیلی مقاوم به مانوز بوده و تنها اریتروسیت هایی که با اسید تانیک تیمار شده اند را آگلوتینه می کند. سویه های کلبسیلا پنومونیه با پیلی تیپ ۳ می توانند به سلول های اپیتلیال و اندوتلیال دستگاه ادراری و تنفسی متصل شوند. این پیلی در کلیه ها موجب چسبندگی باکتری به غشاء پایه توبولی، کپسول لومن و عروق کلیوی می شود (۳۱، ۴۳). ادهزین k29CF که بر روی پلاسمید حامل ژن های مقاومت (پلاسمید R) حمل شده و باعث چسبندگی باکتری به رده های سلولی انسانی ۴۰۷ روده و Caco-2 در کشت سلولی می باشد (۳۱). ادهزین دیگر که تحت عنوان ادهزین تجمعی^۷ خوانده می شود به نظر می رسد که ترکیبی از ماده خارج سلولی شبه کپسولی باشد که با الگوی چسبندگی خاصی به سلول روده ای می چسبد. ادهزین دیگر از نوع فیمبریه ای (پیلی) که عامل کلونیزاسیون باکتری در روده انسان است، KPF-28 نام دارد.

۱-۵-۳ لیپولی ساکارید

لیپولی ساکارید از سه ناحیه مشخص تشکیل شده که به ترتیب از داخل به خارج شامل: لیپید A، پلی ساکارید مرکزی و آنتی ژن O می باشد. ۹ سروتیپ از آنتی ژن O در کلبسیلا پنومونیه شناسایی شده که سروتیپ O1 غالب می باشد. آنتی ژن O در کلبسیلا پنومونیه نقش مهمی در حفاظت آن در مقابل اثر کشندگی کمپلمان ایفا می کند (۱۷). لیپید A در لایه بیرونی غشاء خارجی شناور است و به عنوان اندوتوکسین سبب تحریک پاسخ

⁷ Aggregative adhesion

ایمنی بواسطه انتقال پیام از طریق $TLA4^8$ سطح ماکروفاژها و دندریتیک سل ها می گردد. ناحیه مرکزی سبب اتصال آنتی ژن O به لیپید A شده و بدلیل دارا بودن گروه های فسفات دارای شارژ منفی می باشد (۴۴).

۱-۵-۴ سیدروفورها

آهن عنصر اساسی برای رشد باکتری ها می باشد که در ساختار آنزیم ها و فرایند انتقال الکترون و اکسیژن شرکت دارد (۴۵). باکتری ها از طریق ترشح مولکول هایی با وزن مولکولی پائین به نام سیدروفورها که قدرت اتصال زیاد به آهن را دارند، آهن مورد نیاز برای رشد خود را تامین می کنند. دو گروه مختلف از سیدروفور توسط جنس کلبسیلا تولید می شود که شامل: فنولات ها (انتروباکتین) و هیدروکسامات ها (آئروباکتین) می باشد. اکثر جنس های خانواده انتروباکتریاسه انتروباکتین ترشح می کنند اما تعداد کمی آئروباکتین تولید می نمایند. بر طبق بررسی های انجام شده در سال ۱۹۸۶ مشاهده شد که بین ژن آئروباکتین و شدت بیماریزایی سویه های کلبسیلا پنومونیه ارتباط مستقیم وجود دارد، به گونه ای که با انتقال ژن آئروباکتین کلون شده در پلاسمید تعدادی از سویه های کلبسیلا پنومونیه K1 و K2 به سویه های فاقد بیماریزایی و سیدروفور منفی، افزایش چشمگیری در بیماریزایی در مدل حیوانی مشاهده گردید (۴۵). گونه های کلبسیلا یک نوع دیگر از سیدروفور تحت عنوان یرسینا باکتین تولید می کنند که نقش آن در بیماریزایی هنوز کاملاً مشخص نمی باشد (۱۷).

۱-۵-۵ توکسین

سویه های کلبسیلا پنومونیه، انتروتوکسین مقاوم در برابر حرارتی را تولید کرده که در نتیجه ترشح آن در روده کوچک، ترشح آب و الکترولیت ها به داخل روده زیاد شده و منجر به بروز اسهال می گردد. سوش های تولید

⁸ Toll-like receptor- 4

کننده انتروتوکسین از بیماران مبتلا به اسپروی گرمسیری جداسازی شده اند. این توکسین شبیه به توکسین مقاوم به حرارت ST در اشرشیا کلی است و احتمال می رود که پلاسمید حاصل این ژن از سویه های اشرشیا کلی به کلبسیلا پنومونیه منتقل شده اند (۴۶،۴۷).

۱-۶ روش های تایپینگ کلبسیلا پنومونیه

از گذشته تاکنون، روش های تایپینگ یا تعیین گونه مختلفی جهت مطالعات اپیدمیولوژیکی باکتری ها ابداع و مورد استفاده قرار گرفته است. به طوری کلی این روش ها یا بر پایه ویژگی های فنوتیپی به عبارتی صفات قابل دیده شدن هستند، که فنوتیپینگ^۹ نام دارند و یا بر اساس ویژگی های ژنوتیپی به عبارتی صفات غیر قابل دیدن هستند، که ژنوتیپینگ^{۱۰} نام دارند. امروزه، با توجه به ایجاد و گسترش روش های مولکولی جدید، بیشتر روش های تایپینگ بر اساس روش های مولکولی یا ژنوتیپینگ می باشند، البته نتایج حاصل از مطالعات اپیدمیولوژیک مولکولی باکتری ها، به روش تایپینگ و طرح مطالعه مورد نظر بستگی داشته و بنابراین انتخاب روش مناسب، در افزایش درک در مورد بیماری زایی، نحوه انتقال و روش های موثر جلوگیری از بیماری موثر می باشد (۴۸).

۱-۶-۱ فنوتایپینگ

در سیستم های سنتی تایپینگ، جهت متمایز نمودن باکتری ها، از روش های مبتنی بر فنوتیپ استفاده می شده است، برخی از این روش ها عبارتند از سروتایپینگ^{۱۱}، بیوتایپینگ^{۱۲}، فاژتایپینگ^{۱۳} و آنتی بیوگرام، که در آن

^۹ Phenotyping

^{۱۰} Genotyping

^{۱۱} Serotyping

^{۱۲} Biotyping

^{۱۳} Phagetyping

حساسیت به یک یا چند دارو سنجیده می‌شود. در برخی موارد این روش‌ها در توصیف اپیدمیولوژی بیماری‌های عفونی مفید بوده‌اند. معمولاً این روش‌ها دارای اشکالات اساسی مانند: تغییر زیاد در نتایج، کار آزمایشگاهی بسیار زیاد و کندی فرایند می‌باشند طوری که ارزش علمی و عملی آن‌ها در مطالعات اپیدمیولوژی با چالش جدی مواجه شده است. در پاسخ به این محدودیت‌ها، روش‌های مبتنی بر بیولوژی مولکولی ایجاد شده است تا به عنوان روش‌های تایپینگ اپیدمیولوژی در مطالعات باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و پروتوزوئرها استفاده گردند.

در این روش‌ها از بخش‌های ساختاری میکرو ارگانیسم برای طبقه‌بندی آن استفاده می‌شود. از جمله این روش‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

۱-۱-۶-۱ بیوتایپینگ

اساس این روش طبقه‌بندی باکتری‌ها بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک آنها می‌باشد که در واقع متداولترین روش تایپینگ در آزمایشگاه‌های کوچک است. ولی با توجه به استفاده زیاد از محیط‌های کشت و نیاز به مدت زمان طولانی برای حصول پاسخ، بیوتایپینگ روش مناسبی برای بررسی‌های اپیدمیولوژیک نبوده و باید با سایر روش‌ها به صورت همزمان مورد استفاده قرار گیرد.

۲-۱-۶-۱ سروتایپینگ

روش سروتایپینگ یکی از معمول‌ترین روش‌هایی می‌باشد که برای تایپینگ سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مورد استفاده قرار می‌گیرد. اساس این روش استفاده از دو ساختار مهم آنتی ژنیک این باکتری‌ها یعنی لیپولی ساکارید و کپسول پلی ساکاریدی می‌باشد. لیپولی ساکارید یا آنتی ژن O در ساختار LPS باکتری وجود داشته و بر اساس آن ۹ آنتی ژن O در این باکتری شناسایی شده است. با توجه به اینکه این آنتی ژن توسط

کپسول پوشیده شده و در نتیجه آن این آنتی ژن دور از دسترس سیستم ایمنی قرار می گیرد، طبقه بندی بر اساس این آنتی ژن مشکل خواهد بود (۴۹). اکثر ایزوله های کلینیکی کلبسیلا را می توان با تیپ بندی مولکولی شناسایی کرد ولی اشکال این روش هم در این است که امکان واکنش های متقاطع سرولوژیکی بین ۷۷ تیپ کپسولی وجود دارد و با توجه به مشاهده برخی از واکنش های ضعیف در این روش تایپینگ، تفسیر نتایج حاصل از آنها مشکل خواهد بود. از طرفی عدم دسترسی تجاری به همه آنتی سرم های ضد کپسولی باعث شده که این تکنیک اغلب در آزمایشگاه های خاصی انجام شود، ولی می توان با استفاده از ژن های مرتبط به یک سروتیپ خاص و تکثیر آن با استفاده از تکنیک مولکولی PCR، نوع آنتی ژن کپسولی را در سویه مورد نظر شناسایی کرد (۴۹). مطالعات انجام شده در سالهای اخیر نشان می دهند که می توان از ژن *magA* برای شناسایی آنتی ژن کپسولی K1 استفاده کرد (۵۰، ۵۱).

۱-۶-۳ باکتریوسین تایپینگ

باکتریوسین ها، پروتئین های باکتریوسیدی هستند که توسط برخی از باکتری ها تولید شده که از رشد تعداد دیگری از باکتری ها از همان جنس و یا جنس دیگر جلوگیری می کنند. یک ایزوله باکتریایی می تواند از طریق توانایی اش در مهار یک سویه خاص و یا از لحاظ حساسیت به باکتریوسین هایی که توسط گروهی از سویه های تولید کننده باکتریوسین سنتز می شوند، شناسایی گردد. به علت ناپایداری باکتریوسین ها، تولید آنها در محیط مایع کم بوده و ماندگاری ضعیفی دارند. با این وجود از این روش با انجام اصلاحاتی برای تایپینگ کلبسیلا های محیطی و بالینی استفاده می شود (۵۲، ۵۳).

۴-۱-۶-۱ فازتایپینگ

فازتایپینگ کلبسیلا برای اولین بار در دهه ۱۹۶۰ صورت گرفت. اساس این روش استفاده از فازهای معتدل برای افتراق بین گونه های کلبسیلا می باشد و با وجود اینکه واکنش فاز به راحتی قابل تفسیر بوده و تکرار پذیری آن قابل قبول می باشد ولی قدرت تایپینگ آن بین ۶۷-۱۹٪ متغیر می باشد و باید با سایر روش های تایپینگ استفاده شود که معمولا به عنوان یک روش دوم در ترکیب با تست های سرولوژیکی مورد استفاده قرار می گیرد (۴۷، ۵۴).

۵-۱-۶-۱ آنتی بیوگرام

این روش تکنیک مناسبی است که می توان از آن برای بررسی حساسیت و مقاومت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های رایج در درمان عفونت های باکتریایی استفاده نمود. ولی استفاده آن برای تایپینگ سویه ها، با توجه به اینکه ممکن است الگوهای حساسیت مشابهی در بین سویه ها وجود داشته باشد، دارای محدودیت می باشد. به طور کلی می توان بیان کرد که روش های فنوتیپی قدرت تمایز، تکرار پذیری و تیپ بندی به صورت کامل را ندارند.

۲-۶-۱ ژنوتایپینگ^{۱۴}

ژنوتایپینگ به فرآیندی گفته می شود که به وسیله آن به بررسی ژنوتایپ^{۱۵} افراد که همان خزانه ژنتیکی آنها است پرداخته می شود، به عبارتی در ژنوتایپینگ تفاوت ها و شباهت های توالی DNA در افراد یک جامعه که این جامعه می تواند انسانها، گیاهان، جانوران، میکروارگانیسم ها شامل: باکتریها، ویروسها و غیره باشند، مورد بررسی قرار می گیرد و با افراد همان جامعه یا جامعه دیگر به منظور رسیدن به مقاصد مختلف، مقایسه می

¹⁴ Genotyping

¹⁵ Genotype

گردد. یکی از کاربرد های ژنوتایپینگ در یافتن منابع آلوده کننده عفونت در بیمارستان ها به هنگام اپیدمی بیماری خاص، به منظور کنترل و جلوگیری از انتقال عفونت و عامل بیماریزا می باشد، که اپیدمیولوژی مولکولی نیز گفته می شود. ابزارهای مورد استفاده در ژنوتایپینگ همان روش های مولکولی می باشد. اگر به بررسی قسمت های خاصی از DNA پرداخته شود روش های Mass-Sequencing Technologies نام دارد و اگر به بررسی کل توالی DNA پرداخته شود Whole Genome Sequencing نام می گیرد (۵۵).

برخی از روش های انگشت نگاری^{۱۶} ژنومی در حال حاضر به عنوان مناسب ترین روش ها برای ژنوتایپینگ میکروارگانیزم ها جهت اهداف اپیدمیولوژیکی در نظر گرفته می شوند. این روش ها شامل PFGE، ریبوتایپینگ^{۱۷}، و برخی از روش های تایپینگ مبتنی بر PCR مانند چندشکلی DNA با تکثیر تصادفی^{۱۸} یا RAPD، چند شکلی طول قطعه تکثیر یافته^{۱۹} یا AFLP، تکثیر عناصر (توالی های) تکرار شونده^{۲۰} و تعداد متغیر توالی های تکراری پشت سر هم^{۲۱} یا VNTR می باشند. تمامی این روش ها از میدان الکتریکی برای تفکیک قطعات DNA، مانند قطعات هضم شده با آنزیم های اندونوکلاز اختصاصی، قطعات DNA تکثیر شده و یا کل کروموزوم یا پلاسמיד، به الگوی منحصر به فرد یا انگشت نگاری هایی که توسط رنگ آمیزی DNA با اتیدیوم بروماید یا توسط دوره سازی اسید نوکلئیک قابل مطالعه می شوند، استفاده می کنند (۵۶).

۱-۲-۶-۱ انواع روش های ژنوتایپینگ از نظر هدف آن

روش های ژنوتایپینگ را می توان در دو گروه روش های مقایسه ای و روش های کتابخانه ای قرار داد. روش های مقایسه ای در بیشتر موارد در بررسی های اپیدمیولوژی برای کمک به کنترل کوتاه مدت انتقال در بیمارستان یا

¹⁶ Fingerprinting

¹⁷ Ribotyping

¹⁸ Random Amplified Polymorphic DNA

¹⁹ Amplified Fragment Length Polymorphism

²⁰ Repetative elements PCR

²¹ Variable number of tandem repeat

جمعیت مورد نظر مورد استفاده‌اند. در این نوع بررسی هدف از ژنوتایپینگ مقایسه تعداد محدودی از سویه های جمع‌آوری شده طی یک دوره چند روزه تا چند ماهه برای شناسایی سویه‌های مرتبط کلونالی (اپیدمی) و سویه های نامرتبط (تک گیر)^{۲۲} می باشد.

روش های مناسب ژنوتایپینگ برای این کاربرد باید قابل تکرار بوده، دارای شاخص^{۲۳} بالای تفکیک پذیری (۰/۹۵ >) و دارای قابلیت تایپ کنندگی کامل (ایجاد نتایج برای هر موجود) باشند. روش های مفید برای این هدف شامل: PFGE, ERIC-PCR, REP-PCR, AP-PCR و تکثیر توالی های تکرار شونده بین ژنی^{۲۴} می باشند (57).

روش های ژنوتایپینگ کتابخانه ای بیشتر در بررسی‌های مربوط به بروز اپیدمیولوژی ها در آینده کاربرد دارند. در این نوع روش ژنوتایپینگ، داده‌ها جمع‌آوری شده و بعد از مدت زمان طولانی گاهی تا دهه ها بعد تحلیل می شوند بنابراین نیاز به استفاده از سویه های میکروبی استاندارد شده با قابلیت تکرار پذیری بالا را دارند. سیستم های تایپینگ کتابخانه ای برای ارزیابی بلند مدت استراتژی های جلوگیری و برای شناسایی و ردیابی عفونت های غیرمنتظره^{۲۵} استفاده می شوند. روش مورد استفاده باید دارای استاندارد بسیار بالایی بوده و همچنین، ایجاد یک روش پربازده، جهت ایجاد نتایج معنی دار^{۲۶}، ضروری است. روش های مناسب برای این هدف شامل RFLP، ریبوتایپینگ، انگشت نگاری توالی داخل توسط کاوشگر، تایپینگ PCR عناصر تکراری فاصله انداز (S rDNA ۱۶-۲۳ و عناصر بین-IS^{۲۷})، تکثیر انتخابی قطعات محدود شده ژنومی، تایپینگ بر

²² Sporadic

²³ Index

²⁴ Interrepetitive element PCR typing

²⁵ Emerging

²⁶ Meaningful

²⁷ Inter-IS (insertion sequence) elements

اساس توالی آلی چند جایگاهی (PCR-RFLP، توالی یابی PCR) و الگوهای دورگه سازی الیگونوکلئوتیدی با تراکم بالا (تراشه DNA) می باشند (۴۸)

۱-۶-۲-۲ انواع روش‌های ژنوتیپینگ از نظر انجام کار

از نظر مکانیزم های انجام، روش‌های انگشت نگاری ژنتیکی به طور کلی به دو گروه تقسیم می شوند، روش‌های مبتنی بر معیارهای غیر مستقیم توالی‌های ژنتیکی مانند RAPD-PCR و PFGE و یا روش‌های مبتنی بر معیارهای مستقیم توالی‌های ژنتیکی مانند تایپینگ توالی چندگانه^{۲۸} یا MLST، توالی یابی کامل ژنوم باکتری، استفاده از تکنولوژی ریزآرایه^{۲۹}، و هیبریداسیون مقایسه‌ای^{۳۰} ژنوم.

البته برای بیشتر مطالعات اپیدمیولوژیکی دو عامل تعیین کننده هزینه و زمان، استفاده از روش‌هایی را که بر اساس توالی‌های مستقیم ژنومی می باشند محدود می‌سازد. برای مثال هزینه توالی یابی کامل ژنوم یک باکتری در سال ۲۰۰۵ حدود ۱۰۰ تا ۵۰۰ برابر هزینه هیبریداسیون مقایسه‌ای (۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ دلار در مقابل ۱۰۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰۰ دلار) برای هر سویه بوده است و همچنین هزینه روش MLST (حدود ۱۴۰ دلار) به مراتب بسیار گران‌تر از روش PFGE (حدود ۲۰ دلار برای هر سویه) است. در روش های مرسوم مطالعات اپیدمیولوژیک توالی یک یا چند منطقه ژنومی با هم مقایسه می‌شوند، برای مثال در MLST چند منطقه از ژنوم توالی یابی شده و با هم مقایسه می‌شوند. در برخی از روش‌ها که مبتنی بر استفاده از آنزیم‌های اندونوکلئاز است با استفاده از آنزیم بخشی از ژنوم یا تمام آن به قطعاتی بریده می‌شود. برای مثال در PFGE تمام ژنوم با آنزیم‌های اندونوکلئاز بریده شد و الگوی حاصله در سویه‌های مختلف مقایسه می‌شوند. تعداد و اندازه قطعات به دست آمده بستگی به تعداد جایگاه‌های برش آنزیمی دارد، بنابراین این روش اندازه‌گیری، روش اندازه‌گیری غیر

²⁸ Multilocus Sequence Typing

²⁹ Microarray

³⁰ Comparative hybridization

مستقیم از توالی ژنوم است. در بین روش‌های مولکولی PFGE به عنوان روش مرجع^{۳۱} برای اکثر سویه‌های بیماریزای بیمارستانی، از جمله کلبسیلا پنومونیه در نظر گرفته می‌شود که این به علت توانایی افتراق بالا^{۳۲}، قابلیت تکرار پذیری^{۳۳}، تفسیر ساده و کاربرد عمومی^{۳۴} آن است.

۱-۶-۲-۳ توالی‌یابی کامل ژنوم

این روش دارای قدرت تفکیک کنندگی بالایی بوده و همچنین بسیار تکرار پذیر است. از نظر زمان انجام با روش‌های مرسوم فعلی ممکن است ماه‌ها به طول انجامد و هزینه آن نیز در حال حاضر بالاست. البته با پیشرفت‌های سریعی که در زمینه توالی‌یابی DNA حاصل شده کاهش چشمگیری در زمان و هزینه انجام این روش ایجاد شده است که ممکن است این روش را در آینده نه چندان دور به عنوان مناسب‌ترین و تنها روش با کارایی بسیار بالا معرفی نماید.

۱-۶-۲-۴ هدف قرار دادن توالی‌های تکراری ژنوم

در این روش‌ها توالی‌های خاصی از ژنوم توسط PCR، تکثیر شده و بررسی می‌شوند. به طوری کلی این روش‌ها شامل PCR انواع توالی‌های زیر می‌باشند:

۱. توالی‌های پالیندرومی خارج ژنی تکراری^{۳۵}

۲. توالی درون ژنی تکراری انتروباکتریایی^{۳۶}

۳. عنصر تکراری دوتایی^{۳۷}

³¹ Reference method

³² Discriminatory ability

³³ Reproducibility

³⁴ Universal application

³⁵ Repetitive Extragenic Palindromic Sequences or REP

³⁶ Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus or ERIC

³⁷ Double Repetitive Element or DRE

۴. توالی های الحاق شوند^{۳۸}

۵. توالی های تکراری چندشکل و غنی از GC^{۳۹}

در مجموع این گروه از روش ها دارای قدرت تمایز دهندگی و تکرار پذیری متوسطی می باشند (58,56).

۱-۶-۵ توالی یابی مستقیم یک یا چند منطقه ژنتیکی

این روش ها دارای قدرت تفکیک متوسط به بالا هستند و از نظر تکرار پذیری توان بالایی دارند. در روش هایی که تنها یک منطقه ژنی توالی یابی شود، روش را روش متمرکز یا منطقه ای می نامند. زمان مورد نیاز برای انجام ۲ تا ۳ روز بوده و نیازمند تجهیزات خاص خود می باشد. روش تایپینگ MLST دارای قدرت تفکیک کنندگی متوسط به بالا بوده که این عامل توسط ژن های انتخاب شده تعیین می شود و از نظر تکرار پذیری و قابلیت تمایز دارای قدرت بالایی است. از آنجا که در این روش چند منطقه از ژنوم انتخاب می شود، این روش، روش منتشر می باشد. این تکنیک نیازمند تجهیزات خاص خود بوده و از نظر اجرایی نیازمند کار زیادی می باشد (58,48).

۱-۷ عوامل ضد میکروبی

۱-۷-۱ تاریخچه

کشف عوامل ضد میکروبی طی قرن بیستم میلادی باعث کاهش درد و رنج و نجات جان میلیون ها انسان گردید. بسیاری از بیماری های جدی عفونی بوسیله این عوامل ضد میکروبی تحت کنترل انسان درآمدند و باعث گسترش دست آوردهای بزرگی در این زمینه، در اواخر قرن اخیر شد.

³⁸ Insertional Sequences or IS

³⁹ Polymorphic GC-rich Repetitive Sequences or PGRS

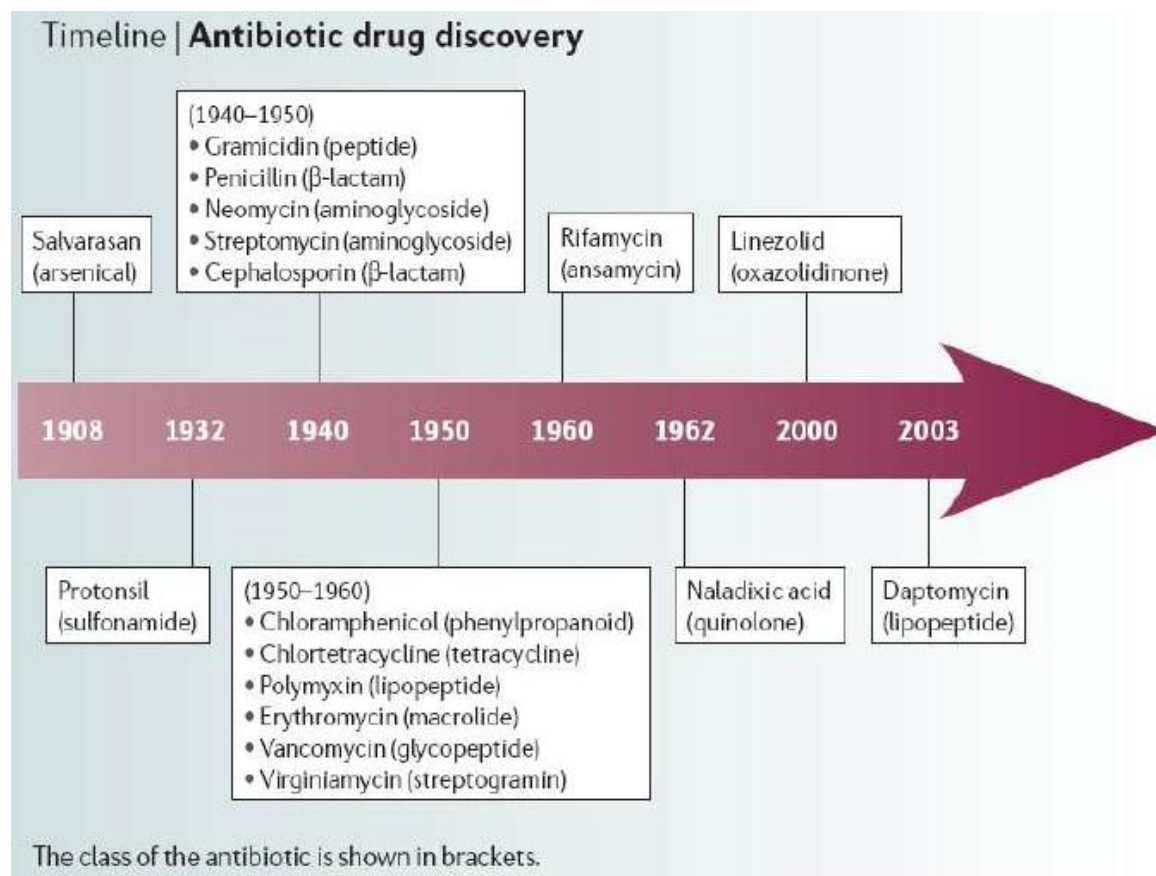
در سپتامبر سال ۱۹۲۸ Alexander Fleming کشف کرد که کپک پنی سیلین از رشد استافیلوکوکوس جلوگیری می کند، وی تصمیم گرفت این پدیده را بیشتر مورد بررسی قرار دهد (59). کشف این واقعیت را شروع عصر آنتی بیوتیک می دانند. البته یافته های فلمینگ در واقعیت کشف مجدد مشاهدات فیزیکدان انگلیسی، John Tyndall، در سال ۱۸۷۵ بوده است (59).

در حین یکی از آزمایشات، Tyndall، می خواست در یابد که آیا باکتری ها در اتمسفر پخش شده اند یا به صورت به هم چسبیده درون ابرها وجود دارند. برای این کار لوله های آزمایش حاوی براث را بدون درب، انکوبه کرد. بعد از انکوباسیون تعدادی از لوله ها شفاف باقی مانده بودند که نشان دهنده این بود که باکتری ها در اتمسفر پراکنده نیستند ولی نکته مهمتری که او مشاهده کرد پنی سیلیوم هایی بودند که بر سطح براث موجود در بعضی لوله ها رشد کرده بودند. نبردی بین باکتری و کپک رخ داده بود و در هر نمونه ای که کپک ضخیم تر و منسجم تر بود، باکتری ها مرده بودند و یا بی حرکت شده و به صورت رسوب در ته لوله ته نشین شده بودند. Tyndall مشاهدات خود را بیشتر از این دنبال نکرد و قدرت پنی سیلیوم ناشناخته باقی ماند، تا اینکه Fleming به توانایی پنی سیلین در کشتن باکتری ها پی برد (59).

در بهار سال ۱۹۴۰، Florey و Chain از دانشگاه آکسفورد توانستند مقادیر اندکی پودر زردرنگ را از کپکی که فلمینگ کشف کرده بود، بدست بیاورند. این امر آغاز اولین تولید تجاری پنی سیلین بود. در سال ۱۹۴۵ جایزه نوبل پزشکی به Fleming، Florey و chain اهدا گردید (60).

طی سال های ۱۹۴۰ تا ۱۹۶۰ عوامل ضد میکروبی زیاد دیگری شناخته شدند و گسترش پیدا کردند (شکل ۱). آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام های دیگری علاوه بر پنی سیلین، تتراسایکلین، ماکرولیدها و گلیکو پپتیدها

مثال هایی از کلاس های جدید آنتی بیوتیکی هستند که گسترش یافتند. ولی، بین معرفی کینولون ها در سال ۱۹۶۲ و کلاس ساختاری جدید بعدی آنتی بیوتیک ها که اگزازولیدون ها نام داشتند، ۴۰ سال فاصله افتاد. متأسفانه، کارخانه های داروسازی بزرگ اندکی در عرصه تولید آنتی بیوتیک ها برای بیماری های عفونی فعالیت دارند و این آینده تولید آنتی بیوتیک های جدید را در آینده خدشه دار می کند.



شکل ۲: تاریخ کشف آنتی بیوتیک ها

۲-۷-۱ عوامل ضد میکروبی

عوامل ضد میکروبی مولکول هایی هستند که میکروب ها (هم باکتری ها و هم قارچ ها) را از رشد باز داشته و یا آن ها را کاملاً می کشند. عوامل ضد میکروبی اغلب محصول باکتری های خاک و قارچ ها به همراه گروه بزرگی از باکتری های تولیدکننده آنتی بیوتیک بنام اکتینومیسست ها هستند (۶۱). اکثر عوامل ضد میکروبی که

اوروزه به صورت کلینیکی مورد استفاده قرار می گیرند از محصولات طبیعی فرمتاسیون (فرآیند تخمیر) و یا اصلاح شیمیایی این محصولات (نیمه سنتتیک) به منظور بهبود و ارتقای ویژگی های دارویی و آنتی بیوتیکی آنها مشتق شده اند (۶۲).

عوامل ضد میکروبی را می توان به صورت باکتریسیدال (باکتری کش)، مانند پنی سیلین و یا باکتریواستاتیک (متوقف کننده رشد باکتری، مانند کلروامفنیکل طبقه بندی کرد. عوامل باکتریسیدال باعث مرگ سلول باکتری شده در حالیکه باکتریواستاتیک ها از رشد باکتری ممانعت بعمل می آورند (۶۱).

طبقه بندی آنتی بیوتیک ها را می توان براساس مکانیسم عمل آنها انجام داد (جدول ۱)؛

I. تداخل با سنتز دیواره سلولی

II. ممانعت از سنتز پروتئین

III. تداخل با سنتز نوکلئیک اسید

IV. ایجاد اختلال در چرخه متابولیک

V. مهار عملکرد غشا سلولی (63).

جدول ۳: مکانیسم عمل عوامل ضد میکروبی

Mechanism of action	Antimicrobial agent(s)
1. Interference with cell wall synthesis	β -lactams: penicillins, cephalosporins, carbapenems, monobactams Glycopeptides: vancomycin, teicoplanin
2. Inhibition of protein synthesis: Binding to 50S ribosomal unit Binding to 30S ribosomal unit	Macrolides, chloramphenicol, clindamycin, quinopristin-dalfopristin, linezolid Aminoglycosides, tetracyclines
3. Interference with nucleic acid synthesis: Inhibition of DNA synthesis Inhibition of RNA synthesis	Fluoroquinolones, rifampicin
4. Inhibition of a metabolic pathway	Sulfonamides, folic acid analogous
5. Disruption of bacterial membrane structure	Polymyxins, daptomycin

۸-۱ آمینوگلیکوزیدها

۱-۸-۱ کشف آمینوگلیکوزیدها

استرپتومایسین اولین آمینوگلیکوزیدی بود که توسط Selman Waksman در سال ۱۹۴۴ شناسایی شد. برخلاف پنی سیلین که از قارچ بدست آمده بودف استرپتومایسین اولین آنتی بیوتیکی بود که از منبع باکتریایی بدست م آمد. کشف استرپتومایسین، نقطه برجسته ای در تاریخ عوام ضد میکروبی است زیرا اولین درمان موثر علیه توبرکلوزیس، بیماری ای که مردم در بسیاری از کشورهای جهان از آن رنج می بردند، بود (۶۴). طی سال ها آمینوگلیکوزیدهای زیادی تولید و آزمایش شده اندف ولی درباره تعدادی از مهمترین آنها و آمینوگلیکوزیدهایی که در مطالعه حاضر استفاده شده اند، بیشتر بحث خواهیم کرد (جدول ۴).

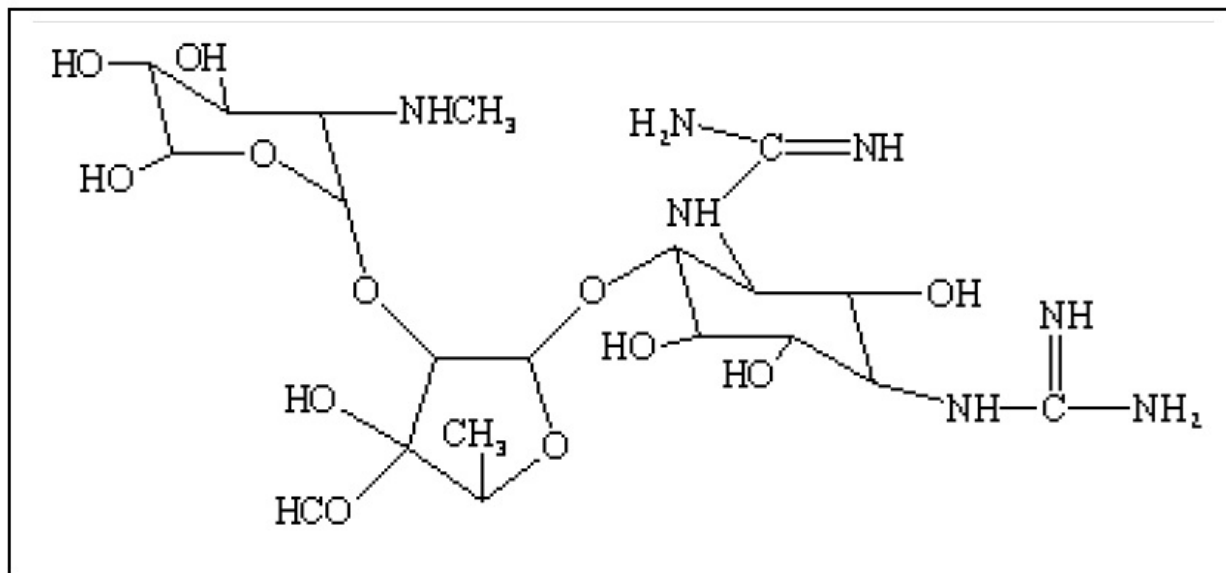
جدول ۴: منشا و تاریخ ساخت آمینوگلیکوزیدها

Aminoglycoside	Isolated/synthesized from	Year of isolation
Streptomycin	<i>Streptomyces griseus</i>	1944
Kanamycin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1957
Gentamicin	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i>	1963
Tobramycin	Synthesized from kanamycin	1967
Amikacin	Synthesized from kanamycin	1972
Arbekacin	Synthesized from dibekacin (syntethic derivative from kanamycin)	1973
Isepamicin	Synthesized from gentamicin	1975
Netilmicin	Synthesized from sisomicin (syntethic derivative from gentamicin)	1976

۲-۸-۱ طبقه بندی آمینوگلیکوزیدها

آمینوگلیکوزیدها خانواده پیچیده ای از ترکیبات هستند و طبقه بندی آنها می تواند براساس ساختار شیمیایی آنها انجام شود. کلاس های ساختاری مختلفی از آمینوگلیکوزیدها وجود دارد که بوسیله یک هسته آمینوسیکلیتول (استرپتامین، ۲-دی اکسی استرپتامین (DOS) یا استرپتیدین) که با پیوند گلیکوزیدی به قندهای آمینو متصل

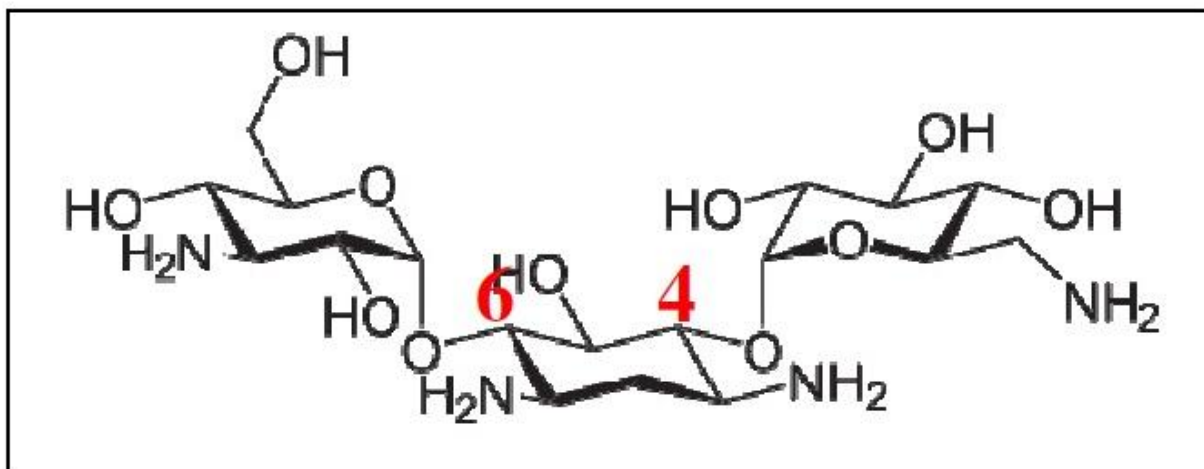
دی اکسی استریتامین (کلاس II)



(I) استریتومایسین از ۳ جزء قندی تشکیل شده است: یک آمینوسیکلیتول (استرپتیدین) متصل به یک پنتوز (استرپتوز) که مجدداً به یک گلوکزآمین متصل شده اند (۶۶) (شکل ۳). مشتقات اتریتومایسین تغییرات نیمه سنتتیک مختلفی بر روی گروه R پنتوز خود دارند. استریتومایسین دارای HCO بعنوان گروه R خود می باشد در حالیکه مشتقات استریتومایسین در همین موقعیت، گروه های R دیگری دارند.

۳.

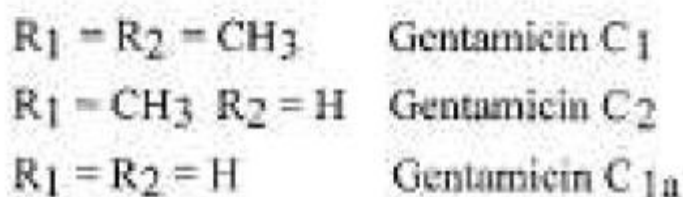
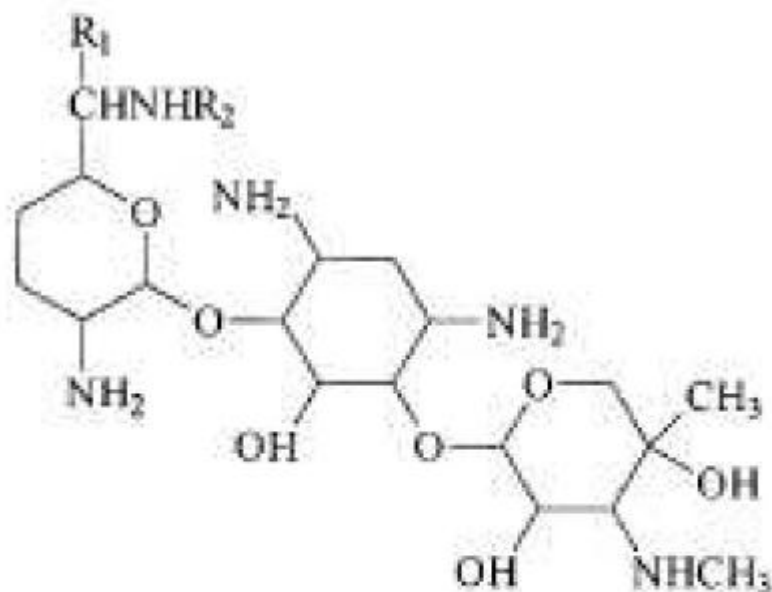
شوند، مشتقات کانامایسین را ایجاد می کنند. کانامایسین اولین دی اکسی استرپتامین آمینوگلیکوزید مفیدی بود که در سال ۱۹۵۷ در ژاپن تولید شد (۶۴).



شکل ۴: ساختار شیمیایی کانامایسین دارای داکسی استرپتامین به عنوان هسته آمینوسیکلیتول. گلوکز آمین به موقعیت ۴ و هگزوز به موقعیت ۶ متصل است. نشان داده شده است که استرپتومایسس، میکرومونوسپورا، باسیلوس و جنس های باکتریایی دیگری توانایی تولید آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید-آمینوسیکلیتول را دارند (۶۴). ترکیبات مشتق شده از استرپتومایسس (*Streptomyces*) بوسیله پسوند “-mycin” نامگذاری می شوند، مانند tobramycin، در حالیکه ترکیبات مشتق شده از میکرومونوسپورا (*Micromonospora*) بوسیله پسوند “-micin” نامگذاری می شوند، مانند gentamicin.

جنتامایسین در بین آمینوگلیکوزیدها منحصر بفرد است زیرا تنها یک مولکول نیست و از ۳ جزء اصلی و تعدادی جزء کوچک تشکیل شده است (۶۷). اجزای اصلی این کمپلکس دارویی عبارت اند از: جنتامایسین های

C_1, C_{1a}, C_2 و C_2 جزء C_2 از ۲ استریایزومر تشکیل شده است: C_2 و C_{2a} (شکل ۵).



شکل ۵: ساختار شیمیایی جنتامایسین C₁, C_{1a} و C₂

۳-۸-۱ ویژگی های آنتی باکتریال و توکسیسیتی آمینوگلیکوزیدها

آمینوگلیکوزیدها بر علیه طیف وسیعی از باکتری های گرم منفی مهم از نظر کلینیکی مانند اشیریشیا کلی، گونه های کلبسیلا، سودوموناس، شیگلا، سالمونلا، انتروباکتر، سیتروباکتر، اسینتوباکتر، پروتئوس، سراشیا، مورگانلا و همچنین گرم مثبت هایی از قبیل استافیلوکوکوس اورئوس و برخی از استرپتوکوک هادر محیط *in vitro* فعالیت نشان می دهند (۶۸). هیچگونه فعالیتی در *in vitro* تا کنون علیه استرپتوکوک پنومونیه، نایسریا گونوره آ، بورخولدريا سپاسيا، استنوتروفوموناس مالتوفیلا و میکروارگانيسم های بی هوازی پیش بینی نشده است. آمینوگلیکوزیدها فقط وقتی بر علیه انتروکوکوس به میزان کافی فعالیت نشان می دهند که همراه با یک آنتی بیوتیک موثر بر دیواره سلولی، مثل بتالاکتام یا ونکومايسين استفاده شوند.

آمینوگلیکوزیدها تعدادی ویژگی منحصر بفرد از خود نشان می دهند که آنها را بعنوان عوامل ضدمیکروبی مفید مطرح می کند (۶۸). فعالیت باکتریسیدالی آمینوگلیکوزیدها بیشتر از اینکه به مدت زمان مواجهه باکتری با غلظت مهارکننده عامل ضدمیکروبی مربوط باشد، به غلظت آنها مربوط است. پتابسیل آمینوگلیکوزیدها برای کشتن باکتری به غلظت آنتی بیوتیک بستگی داشته و با افزایش غلظت، افزایش می یابد. بعلاوه، آمینوگلیکوزیدها به کشتن باکتری، حتی بعد از اینکه توسط باکتری شناسایی شدند، ادامه می دهند که نشان دهنده یک اثر پس-آنتی بیوتیکی^{۴۰} مهم است. احتمالاً این امر بوسیله یک پیوند غیرقابل برگشت محکم با ریبوزوم ایجاد می شود.

فعالیت باکتریسیدالی سینرژیک آمینوگلیکوزیدها همراه با عوامل ضدمیکروبی مهارکننده سنتز دیواره سلولی یکی دیگر از ویژگی های مهم آمینوگلیکوزیدهاست. سینرژسم احتمالاً در نتیجه افزایش برداشت داخل سلولی آمینوگلیکوزیدها رخ می دهد که به دلیل افزایش نفوذپذیری باکتری بعد از مواجهه با بازدارنده های سنتز دیواره سلولی ایجاد می شود. متأسفانه، آمینوگلیکوزیدها می توانند پاسخ های سمی از قبیل اتوتوکسیسیته و سمیت کلیوی ایجاد کنند. در بین آمینوگلیکوزیدها، استرپتومایسس سلول های مویی در گوش داخلی را مورد هدف قرار می دهد و می تواند منجر به از بین رفتن سلول مو و از دست دادن دائمی شنوایی در حداکثر تا ۵٪ بیماران شود (۶۴).

فعالیت باکتریسیدالی وابسته به غلظت و اثر پس-آنتی بیوتیکی به همراه خطر توکسیسیته و سمیت کلیوی از جمله مهمترین دلایلی است که آمینوگلیکوزیدها را فقط بصورت یکبار در روز و در بیمارانی با عملکرد نرمال کلیوی تجویز می کنند (۶۸).

⁴⁰ Post-antibiotic

۴-۸-۱ مکانیسم عملکرد آمینوگلیکوزیدها

آمینوگلیکوزیدها طی یک فرآیند ۲ مرحله ای به باکتری حمله می کنند. ابتدا، برداشت آمینوگلیکوزیدها توسط باکتری که یک فرآیند مهم در فعالیت بیولوژیکی آنهاست. سپس، درون سلول باکتری آمینوگلیکوزید به ریوزوم متصل شده و از سنتز پروتئین ممانعت بعمل می آورد.

۱-۴-۸-۱ برداشت آمینوگلیکوزیدها توسط باکتری

دیواره سلولی باکتری طی یک فرآیند ۳ مرحله ای توسط آمینوگلیکوزید سوراخ می شود؛ که ابتدا مرحله غیروابسته به انرژی (مستقل از انرژی) و متعاقب آن ۲ مرحله وابسته به انرژی رخ می دهد.

در مرحله مستقل از انرژی آمینوگلیکوزید به ترکیبات آنیونی سطحی دیواره سلولی باکتری مانند لیپولی ساکارید، فسفولیپیدها و پروتئین های غشای خارجی در گرم منفی ها و تئیکوئیک اسید و فسفولیپیدها در گرم مثبت ها متصل می شود (۳۵). اتصال به محل های آنیونیک در غشا خارجی در نتیجه جابجایی یون های Mg^{2+} و Ca^{2+} است که مجاور مولکول های لیپولی ساکاریدی متصل شده اند. بر این اساس نفوذپذیری دیواره سلولی باکتری افزایش یافته که منجر به نفوذ مولکول های آمینوگلیکوزید به داخل فضای پری پلاسمیک می شود، این پدیده را اصطلاحاً "Self-promoted Uptake" می نامند.

پس از اتصال سطحی الکترواستاتیک اولیه، فاز اول (I) مرحله وابسته به انرژی آغاز می شود. تعداد کمی از مولکول های آمینوگلیکوزیدی از غشای سیتوپلاسمی عبور می کنند که این فرآیند به یک پتانسیل آستانه برای عبور از غشا نیاز دارد که توسط زنجیره تنفسی متصل به غشا تولید می شود (۶۵). این فرآیند توضیح خوبی است برای اینکه چرا بی هوازی ها که سیستم انتقال الکترون ناکارآمدی دارند بصورت ذاتی نسبت به آمینوگلیکوزیدها مقاومت نشان می دهند.

مولکول های آمینوگلیکوزیدی که به سیتوپلاسم راه پیدا کردند به ریبوزوم متصل شده و باعث بد ترجمه شدن mRNA و در نتیجه تولید پروتئین های غشایی با شکل نامنظم^{۴۱} می شوند. این پروتئین های غشایی باعث ایجاد آسیب در یکپارچگی غشای سیتوپلاسمی می شوند.

نهایتاً، از بین رفتن یکپارچگی غشا سبب آغاز فاز (II) مرحله وابسته به انرژی خواهد شد. غشای سیتوپلاسمی آسیب دیده سبب افزایش جذب مولکول های آمینوگلیکوزید می شود. آمینوگلیکوزید به سرعت در سیتوپلاسم انباشته شده و به صورت برگشت ناپذیری تمام ریبوزوم ها را اشباع می کند و باعث مرگ سلولی می شود. غلظت بیشتر آمینوگلیکوزید، سرعت بیشتر در شروع فاز (II) وابسته به انرژی و در نهایت مرگ سلول باکتری (۶۵، ۶۸).

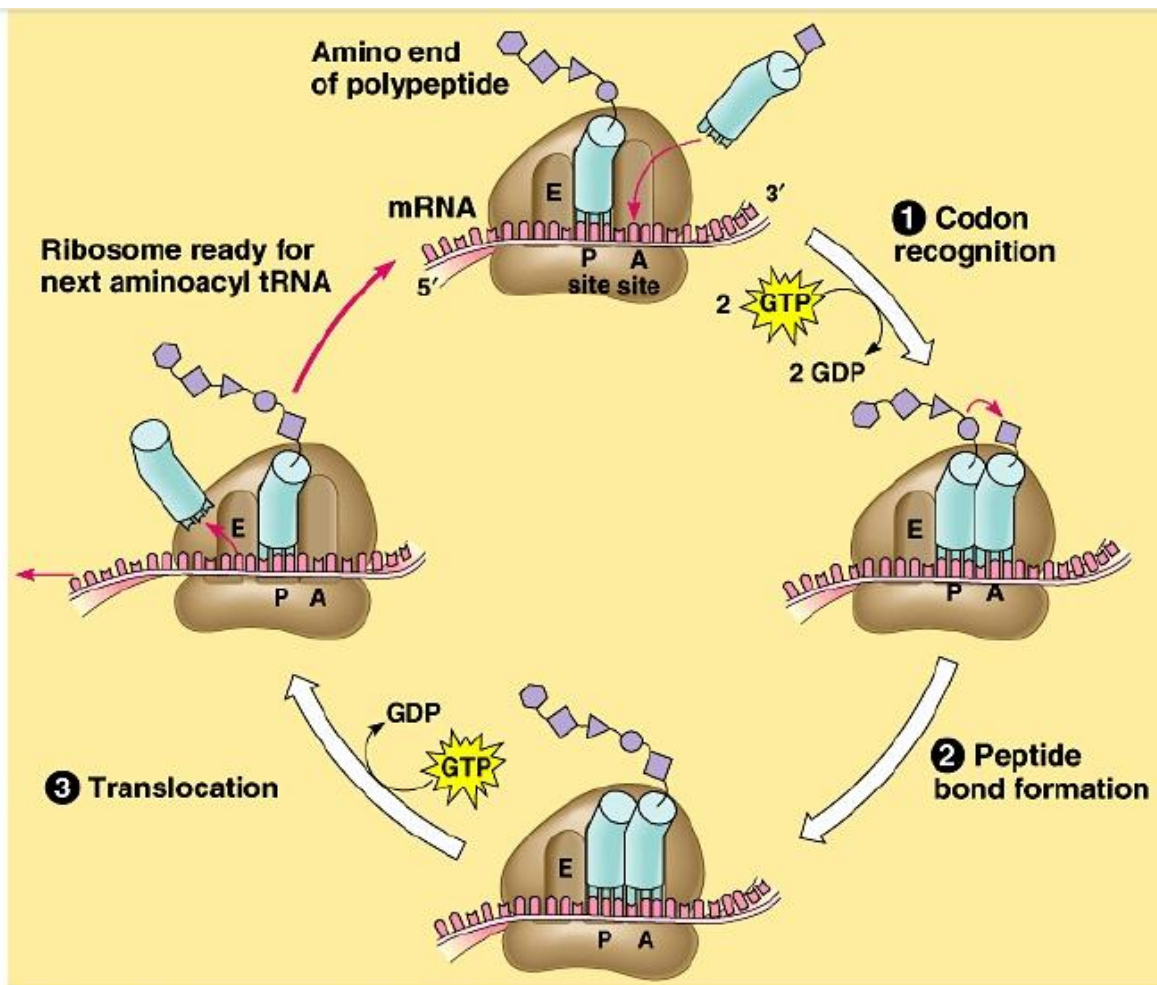
۱-۴-۲ مکانیسم عملکرد مولکولی

ریبوزوم نقش مهمی در ترجمه mRNA به پروتئین را در سلول باکتری ایفا می کند و از ۲ زیرواحد شامل زیرواحد شامل 50s و زیرواحد 30s تشکیل شده است (۶۸). زیرواحد بزرگ (50s) از ۲ مولکول RNA بنام های 5srRNA و 23srRNA به همراه تقریباً ۳۰ پروتئین ساخته شده است. زیرواحد کوچک (30s) نیز از 16srRNA به همراه ۲۰ تا ۲۱ پروتئین تشکیل شده است. طی سنتز پروتئین ها، ریبوزوم mRNA را رمزگشایی کرده و آمینواسیدها را در زنجیره های در حال رشد پلی پپتیدی کنار یکدیگر قرار می دهد. RNA های انتقال دهنده^{۴۲}، RNA های کوچک پایداری هستند که به هر کدام از آنها یک آمینواسید اختصاصی متصل شده است. tRNA به همراه آمینواسید متصل به خود وارد ریبوزوم شده و با سکانس آنتی کدون خود به

⁴¹ misfold

⁴² tRNA

سکانس کدونی ۳ نوکلئوتیدی مربوط به خود که بر روی mRNA قرار گرفته جفت می شود تا آمینواسید مربوطه بدرستی در جای خود در طول زنجیره پلی پپتیدی در حال رشد قرار گیرد (۶۹)(شکل ۶).



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

شکل ۶: سنتز پروتئین

زیرواحد 30s ریبوزوم دارای ۳ جایگاه اتصال مهم از نظر عملکردی برای tRNA است: جایگاه $A^{۴۳}$

(جایگاه پذیرنده)، جایگاه $P^{۴۴}$ (جایگاه پپتیدیل) و جایگاه $E^{۴۵}$ (جایگاه خروج).

⁴³ A-site

⁴⁴ P-site

⁴⁵ E-site

A-site دارای توانایی بخصوصی در متمایز کردن اتصال tRNA درست از نادرست و هدایت فرآیند ترجمه در مسیر صحیح می باشد (۶۸). آمینوگلیکوزید به جایگاه های اختصاصی زیرواحد 30s ریبوزومی متصل شده و سنتز پروتئین را مختل می کنند. بیشتر آمینوگلیکوزیدهای کلاس ۲-دی اکسی استرپتامین آمینوسیکلیتول (مانند جنتامایسین) به صورت اختصاصی به جایگاه A (جایگاه اتصال tRNA) در 16srRNA متصل می شوند. استرپتومایسین که به کلاس استرپتامین آمینوسیکلیتول تعلق دارد، هم به جایگاه A متصل می شود ولی علاوه بر ای ن به rRNA و سایر پروتئین ها نیز اتصال می یابد (۶۴).

۹-۱ مقاومت آنتی بیوتیکی

اکثر پیشرفت هایی که در تولید داروهای ضد میکروبی در اواسط قرن بیستم میلادی آغاز شدند، تغییرات بزرگی را در مبارزه بین انسان ها و بسیاری از میکروارگانیسم هایی که عامل عفونت و بیماری بودند، بوجود آوردند. این امر باعث شد که انسان ها باور کنند که فاتح این میدان اند. اما زمانیکه این داروها مورد استفاده انسان قرار گرفتند، باکتری ها پاسخ های مختلفی را در قالب شکل های متنوعی از مقاومت از خود نشان دادند. هرچه مصرف آنتی بیوتیک ها طی سالیان افزایش پیدا کرد، باکتری ها با شکل های مختلف تری از مقاومت به آنها پاسخ دادند.

میکروب هایی که به یک یا چند عامل ضد میکروبی موجود مقاومت نشان می دهند، در حال ظهور هستند. سازمان بهداشت جهانی (WHO) در سال ۲۰۰۱، استراتژی جهانی WHO برای محدود کردن مقاومت های ضد میکروبی را آغاز کرد که این اولین استراتژی جهانی برا مبارزه با مشکلات جدی بود که بخاطر ظهور و انتشار جهانی مقاومت های ضد میکروبی بوجود آمده بود. این استراتژی بیان می کند که مقاومت ضد میکروبی یک مشکل جهانی است و باید در تمام کشورها این مشکل حل شود.

باکتری ها ممکن است ذاتا به یک یا بیشتر کلاس های عوامل ضد میکروبی مقاومت نشان می دهند. در چنین نمونه هایی تمام سوش های یک گونه باکترایی به آن عوامل ضد میکروبی مقاوم هستند (۶۳). مقاومت همچنین میتواند از طریق موتاسیون *de novo* کسب شده یا از طریق انتقال ژن های مقاومت از ارگانیسم دیگر بوجود آید. مقاومت اکتسابی در تمام جمعیت گونه ها وجود ندارند ولی ممکن است تحت تاثیر فشار تکثیر شده و انتشار یابد.

چندین مکانیسم مختلف وجود دارد که مسئول ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی هستند (۶۳):

I باکتری ممکن است زن های کدکننده آنزیم هایی را کسب کنند که عامل ضد میکروبی را قبل از اینکه اثر کند، غیرفعال نماید.

II باکتری ممکن است پمپ های افلاکس را کسب کند که باعث پمپ شدن عامل ضد میکروبی به بیرون از سلول، قبل از رسیدن به هدفش است.

III باکتری ممکن است تحت تاثیر موتاسیون هایی قرار گیرد که دسترسی عامل ضد میکروبی را به هدف داخل سلولی اش را از طریق تنظیم منفی ژن های پورین (porin) محدود نماید.

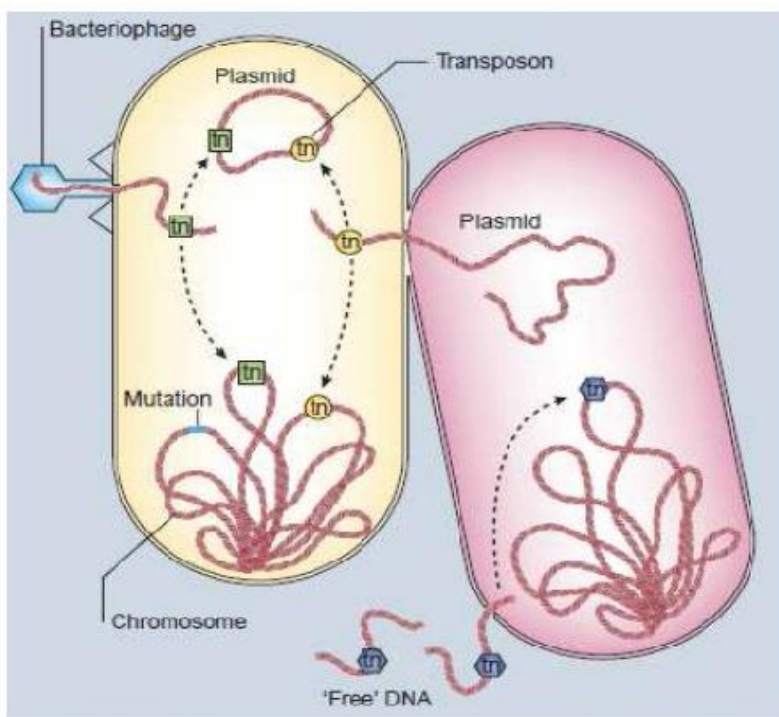
IV و نهائیتا باکتری ممکن است ژن های مختلفی را برای مسیرهای متابولیکی کسب کند که این ژن ها سبب تغییر سلولی هدف های موجود در باکتری شده که این هدف ها دیگر دارای جایگاه اتصال برای عامل ضد میکروبی نخواهند بود.

بطور طبیعی جمعیت حساس باکتری ها ممکن است از طریق موتاسیون ها، انتخاب و یا اکتساب ژن های کدکننده مقاومت از دیگر باکتری ها، نسبت به عوامل ضد میکروبی مقاوم شوند (۶۳). باکتری هایی که ناقل موتاسیون های عامل مقاومت هستند، توسط مصرف آنتی بیوتیک ها انتخاب می شوند، بدین معنی که به سوش

های مقاوم اجازه حیات و تکثیر می دهند، این در حالی است که سوش های حساس کشته می شوند. این حالت، انتقال عمودی ژن ها نامیده می شوند. همچنین ممکن است باکتری مقاومت را از طریق کسب ماده ژنتیکی جدید از ارگانیسم مقاوم دیگری کسب کند که به این حالت انتقال افقی ژن ها گفته می شود.

۱-۸-۱ انتقال افقی ژن ها

انتقال افقی ژن ها اتفاقی است که در آن ارگانیسم بدون اینکه تولیدمثلی صورت دهد، ماده ژنتیکی را از ارگانیسم دیگری وارد سلول خود می کند (۶۹). این اتفاق ممکن است بین سوش های مربوط به یک گونه یا بین باکتری ها یا جنس های مختلف ایجاد شود. DNA می تواند از طریق ۳ مسیر بین باکتری ها انتقال یابد: ترانسفورماسیون، کانژوگاسیون و ترانسداکشن (شکل ۷).



شکل ۷: ترانسفورماسیون، کانژوگاسیون و ترانسداکشن

DNA از باکتری دهنده خارج و توسط باکتری گیرنده دریافت می شود و سلول ایجاد شده با توجه به مکانیسمی که رخ داده است، ترانسفورمانت^{۴۶}، ترانس کانژوگانت^{۴۷} یا ترانسداکدانت^{۴۸} نامیده می شود.

۱-۱-۸-۱ ترانسفورماسیون

جذب DNA برهنه از محیط اطراف ترانسفورماسیون نامیده می شود و این اولین مکانیسم شناخته شده برای انتقال ژن در باکتری ها بوده است (۶۹). مراحل کلی ترانسفورماسیون طبیعی به این بستگی دارد که آیا باکتری گرم مثبت است یا گرم منفی، زیرا باکتری های گرم مثبت فاقد غشا خارجی هستند. در باکتری های گرم منفی :

I DNA ۲ رشته ای (dsDNA) به سطح خارجی باکتری متصل می شود.

II DNA از دیواره سلولی و غشا خارجی عبور می کند.

III یکی از رشته های DNA توسط نوکلئازها از بین می رود.

IV و DNA تک رشته ای (ssDNA) با عبور از غشا داخلی به سیتوپلاسم منتقل می شود (۶۹).

مراحل ترانسفورماسیون در باکتری های گرم مثبت هم کاملاً شبیه گرم منفی هاست با این تفاوت که انتقال از طریق غشا خارجی ضروری نیست.

درون سیتوپلاسم ممکن است DNA تک رشته ای :

I رشته مکمل را سنتز کرده و خود را بصورت یک پلاسمید درآورد.

II بصورت پایدار درون کروموزوم سلول گیرنده از طریق نوترکیبی همولوگ^{۴۹} ایتگره شود.

⁴⁶ Transformants

⁴⁷ Transconjugants(Exconjugants)

⁴⁸ Transductants

⁴⁹ homologous recombination

III و یا از بین برود.

باکتری هایی که بصورت مصنوعی شایستگی^{۵۰} ترانسفورماسیون پیدا می کنند، می توانند DNA^۲ رشته ای جذب کنند. گفته شده است نقش ترانسفورماسیون طبیعی تعمیر DNA، تغذیه و نو ترکیبی^{۵۱} به منظور افزایش تنوع است.

۱-۸-۲ کانژوگاسیون

توانایی انتقال DNA از طریق تماس سلول به سلول کانژوگاسیون نامیده می شود، که اولین بار در سال ۱۹۴۷ توسط Joshua Lederberg و Edward Tatum مشاهده گردید (۶۹). این فرآیند با انتقال پلاسمیدها و عناصر ژنتیکی کروموزومی در ارتباط است.

سیستم انتقال پلاسمیدها و عناصر ژنتیکی کروموزومی با ژن های tra در ارتباط اند (۶۹). این سیستم ها در بین پلاسمیدها و عناصر ژنتیکی کروموزومی شبیه یکدیگرند. در پلاسمیدها ژن های tra می توانند بر روی پلاسمید دیگری در همان سلول فعالیت کنند یعنی دارای tars-acting هستند.

علاوه بر این پلاسمید باید برای انتقال دارای جایگاه oriT باشد. ژن های tra اجزای Mpf^{۵۲} تشکیل زوج جفتگیری و اجزای Dtr^{۵۳} تکثیر و انتقال DNA را کد می کنند. عملکرد Mpf نگه داشتن سلول دهنده و گیرنده در کنار یکدیگر طی فرآیند جفتگیری و تشکیل کانالی است که از طریق آن پروتئین ها و DNA در ارتباط هستند. اجزای Dtr پلاسمید را برای انتقال آماده می کنند.

بطور مختصر فرآیند کانژوگاسیون شامل این مراحل است:

^{۵۰} Competence

^{۵۱} Recombination

^{۵۲} Mating pair formation

^{۵۳} DNA Transfer and Replication

- I** سلول دهنده پیلی هایی را تولید می کند که از طریق آنها می تواند با سلول گیرنده تماس برقرار کند.
- II** پلاسمید خود انتقال دهنده آنزیمی بنام ریلکساز کد می کند که می تواند یک گردن تک رشته ای در محل *oriT* پلاسمید ایجاد کند.
- III** پلاسمید، هلیکازی تولید می کند که ۲ رشته DNA پلاسمید را از هم جدا می کند.
- IV** ریلکساز به انتهای 5'، DNA تک رشته ای متصل شده و آن را به درون گیرنده انتقال می دهد.
- V** درون گیرنده، ریلکساز رشته مکمل DNA تک رشته ای را بازیابی می کند.
- VI** و رشته مکمل DNA تک رشته ای درون سلول دهنده نیز تکمیل می شود.

۳-۱-۸-۱ ترانسداکشن

ترانسداکشن سومین فرآیند شناخته شده انتقال افقی ژن هاست. وقتی DNA از یک سلول به سلولی دیگر توسط ویروس آلوده کننده باکتری که باکتریوفاژ نامیده می شود، انتقال می یابد، ترانسداکشن رخ داده است. ترانسداکشن عامل ایجاد تنوع در باکتری هایی مانند گونه های سالمونلا، استافیلوکوکوس، اشریشیا، سودوموناس و دی سولفو ویبریو شناخته شده است.

در ترانسداکشن عمومی تقریباً هر ژنی که روی کروموزوم سلول دهنده وجود دارد می تواند به سلول گیرنده منتقل شود (۶۹). وقتی سلول باکتریایی توسط فاژی آلوده می شود، ممکن است چرخه لیتیک آغاز گردد. چرخه لیتیک مجموعه ای از مراحل است که وقتی اتفاق می افتد که ویروس درون سلول میزبان تکثیر یافته و باعث لیز سلول میزبان می شود. طی فرآیند همانندسازی قسمتی از DNA ممکن است بطور تصادفی درون ژنوم ویروسی جای گیرد. هنگامی که سلول لیز می شود، این قطعات که، قطعات ترانسداکشنی نامیده می شوند، آزاد می گردند. این قطعات که حاوی قطعات DNA میزبان قبلی هستند می توانند سلول دیگری را آلوده

نمایند. DNA که به صورت تصادفی از میزبان باکتریایی درون ژنوم ویروس قرار گرفته بود، بعداً می تواند در سلول میزبان جدید تحت تاثیر نوآرایی ژنتیکی نیز قرار گیرد.

ترانسداکشن اختصاصی فقط در بعضی از ویروس های معتدل مانند فاژ لامبدا، در *E.coli* اتفاق بیفتد. در این حالت DNA میزبان اینتگره شده و فاژ وارد فاز لیزوژنیک می شود که در آن تکثیر و همانندسازی DNA ویروسی تحت کنترل کروموزوم باکتری میزبان انجام می شود. به محض القاء (شوک، استرس و...) DNA ویروسی از DNA میزبان جدا شده و شروع به تکثیر می کند. در بعضی موارد، DNA بطور صحیح جدا نشده و قسمتی از DNA میزبان هم به همراه DNA ویروسی جدا می شود.

۴-۱-۸-۱ پلاسمیدها

پلاسمیدها مولکول های DNA هستند که به صورت آزاد در سلول باکتری وجود داشته و مستقل از کروموزوم تکثیر و همانندسازی می کند (۶۹). بیشتر پلاسمیدها به شکل حاقوی هستند اما بعضی از آنها به شکل خطی دیده می شوند. تعداد پلاسمیدهای موجود در یک سلول از یک کپی تا صدها کپی متغیر است و حتی یک سلول می تواند پلاسمیدهای متفاوتی را در خود جای می دهد. اندازه پلاسمیدها از تعداد اندکی جفت باز تا اندازه ای به طول کروموزوم می توانند متفاوت باشند.

بطور کلی پلاسمیدها ژن هایی که برای رشد باکتری ضروری باشد را حمل نمی کنند ولی حاوی ژن هایی هستند که برای باکتری میزبان شان مفید است مانند ژن های کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی. بعضی از پلاسمیدها خود انتقال دهنده هستند و توانایی انتقال خود به سایر سلول های باکتریایی را طی فرآیند

کانژوگاسیون دارند (۶۹). این پلاسمیدها که ژن های مربوط به عملکرد انتقال را کد می کنند پلاسمیدهای کانژوگاتیو و یا پلاسمیدهای خود انتقال دهنده^{۵۴} نامیده می شوند.

پلاسمیدهای دیگر تمام ژن های مورد نیاز برای انتقال را کد نمی کنند و در نتیجه به کمک پلاسمیدهای انتقال دهنده برای حرکت بین باکتری های مختلف نیاز دارند. پلاسمیدهای خود انتقال دهنده احتمالا در تمام انواع باکتری ها وجود دارند اما در بیشتر باکتری هایی که مورد مطالعه قرار گرفته اند عبارت اند از: باکتری گرم منفی اشریشیا کلی و گونه های گرم مثبت انتروکوکوس، استرپتوکوکوس، باسیلوس، استافیلوکوکوس و استرپتومایسس.

پلاسمیدهای ناقل ژن های مقاومت برای تمام آنتی بیوتیک هایی که در کلینیک در دسترس اند، شناسایی شده اند و یک پلاسمید به تنهایی می تواند عامل ایجاد مقاومت نسبت به چند عامل ضد میکروبی بوده و مقاومت را بین جنس های مختلف باکتریایی انتقال دهد (۶۹). علاوه بر انتقال ژن های مقاومت، پلاسمیدها می توانند به عنوان ناقل سایر عناصر ژنتیکی مهم مانند ترانسپوزون ها و اینتگرون ها نیز عمل می کنند.

۱-۸-۵ ترانسپوزون ها

ترانسپوزون ها توالی هایی از DNA هستند که توانایی حرکت از یک نقطه DNA به جای دیگری را با کمک آنزیم ترانسپوزاز دارا می باشند (۶۹). به این جابجایی ترانسپوزیشن گفته می شود. کوچکترین ترانسپوزون های موجود در باکتری ها عناصر IS هستند که فقط شامل ژن های مورد نیاز برای ترانسپوزیشن (تغییر مکان) خودشان می باشند. ترانسپوزون ها به عنوان ناقلین ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی شناخته شده اند.

⁵⁴ Self-transmissible

۱-۸-۶ اینتگرون ها

اینتگرون ها سیستم های ژنتیکی ای هستند که مسئول گردهم آوردن عوامل تعیین کننده مقاومت در عناصر ژنتیکی متحرک مانند پلاسمیدها و ترانسپوزون ها می باشند (۷۰). این عناصر متحرک حاوی ژن کد کننده اینتگراز و دارای یک جایگاه att برای اینتگره شده کاست های ژنی که اغلب مقاومت آنتی بیوتیکی را کد می کنند، هستند. اغلب یک پروموتور در ناحیه att حضور دارد که اجازه نسخه برداری از کاست ژنی را صادر می کند (۶۹).

۱-۱۰ مقاومت به آمینوگلیکوزیدها

مقاومت آمینوگلیکوزیدی از طریق ۳ مکانیسم مختلف اتفاق می افتد:

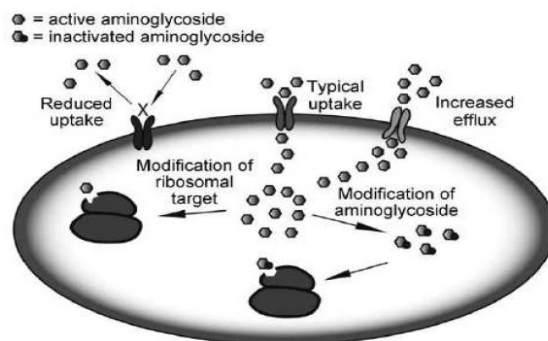
I تغییر اهداف rRNA و پروتئین های ریبوزومی

II کاهش جذب و افزایش پمپ افلاکس

III آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها^{۵۵} (AMEs) (۷۱). مکانیسم سوم در بین ایزوله های کلینیکی

بیشترین ارتباط را با ایجاد مقاومت دارد (۶۴) (شکل ۸). مکانیسم های مختلف مقاومت را نشان می

دهد.



شکل ۸: مکانیسم های مختلف باکتریایی برای ایجاد مقاومت علیه آمینوگلیکوزیدها

⁵⁵ Aminoglycoside Modifying Enzymes

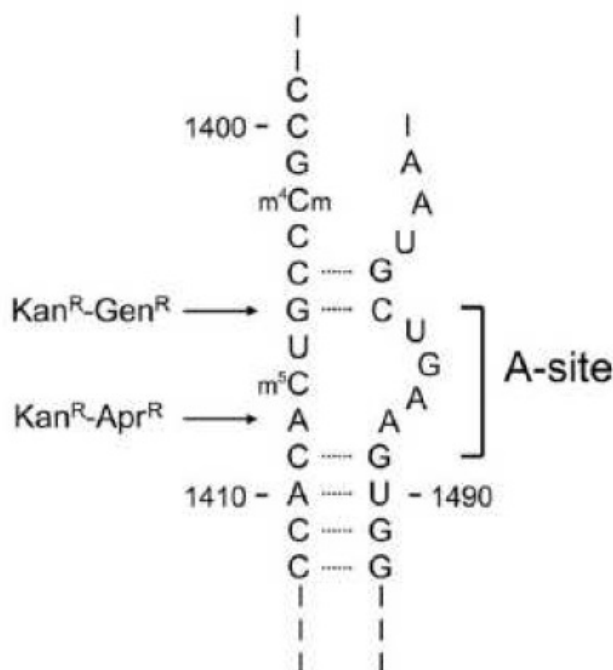
۱-۱۰-۱ ایجاد مقاومت با تغییر جایگاه هدف

مقاومت به آمینوگلیکوزیدها بوسیله ایجاد تغییر در جایگاه هدف از طریق ۲ مسیر ایجاد می شود: یا از طریق تغییر هدف و یا کاتالیز آنزیمی هدف

آمینوگلیکوزیدها به جایگاه A در tRNA یعنی جایی که واکنش کدون و آنتی کدون اتفاق می افتد، متصل می شوند. در بیشتر اوقات این حالت با ایجاد اختلال در اتصال کدون و آنتی کدون صحیح منجر به آسیب کد ژنتیکی و تولید پروتئین نادرست می شود. بیشتر آمینوگلیکوزیدهای کلاس ۲-داکسی استرپتامین (مانند جنتامایسین) به 16srRNA در زیرواحد 30s ریبوزومی متصل می شوند که می توانند با ایجاد اختلاف در جفت شدن کدون و آنتی کدون باعث ایجاد مقاومت در برابر آمینوگلیکوزید شوند (۶۴).

استرپتوماسین که به کلاس استرپتامین آمینوگلیکوزیدی تعلق دارد، اغلب به جایگاه A، 16srRNA متصل می شود ولی می تواند به سایر rRNA ها و پروتئین های ریبوزومی هم متصل شود. در نتیجه، موتاسیون 16srRNA و پروتئین های ریبوزومی می تواند باعث ایجاد مقاومت سطح بالایی به استرپتومایسین گردد.

بسیاری از ارگاناسم های تولیدکننده آمینوگلیکوزید مانند گونه استرپتومایسس و گونه میکرومونوسپورا قادر به بیان متیلازهای موثر بر 16srRNA می باشند که این متیلازها توانایی متیله کردن نوکلئوتیدهای جایگاه A، در 16srRNA را دارا می باشند و طیف وسیعی از مقاومت های آمینوگلیکوزیدی را ایجاد می کنند (شکل ۹). این روش یک راه موثر در جلوگیری از مهار سنتز پروتئین خودشان می باشد و چندین 16srRNA متیلاز که به طور ذاتی در بین اکتینومیسست ها وجود دارد شناسایی شده است. بعلاوه، 16srRNA متیلازهایی که با عناصر ژنتیکی مانند پلاسمیدها و ترانسپوزون ها متحرک در ارتباط هستند، با سوش هایی از باکتری های گرم منفی متتند کلبسیلا پنومونیه، اشریشیا کلی، و سودوموناس آئروژینوزا دارای ارتباط کلینیکی هستند.



شکل ۹: 16S rRNA متیلاز بوسیله متیلاسیون جایگاه A در 16S rRNA باعث مقاومت به آمینوگلیکوزیدها از طریق تغییر جایگاه هدف می شود.

۱-۱۰-۲ ایجاد مقاومت بوسیله کاهش جذب و افزایش پمپ افلاکس

مقاومت آمینوگلیکوزیدی می تواند در نتیجه مکانیسمی باشد که جذب آمینوگلیکوزیدها را به درون سیتوپلاسم محدود می کند. برای دستیابی به هدف که همان ریبوزوم است آمینوگلیکوزیدها باید از غشایی پلاسمایی و در مورد باکتری های گرم منفی از غشای خارجی عبور کنند (۶۴). این جذب آمینوگلیکوزیدی نیازمند فرآیند تنفس است که از طریق یک پتانسیل الکتریکی که از غشا سیتوپلاسمی عبور می کند تامین می شود. بنابراین موتاسیون در اجزای زنجیره الکترونی باعث کاهش پتانسیل الکتریکی و در نتیجه کاهش جذب آمینوگلیکوزید و مقاومت می شود.

در گونه هایی مانند سودوموناس، بورخولدريا و استنوتروفوموناس سیستم های افلاکس بین غشایی وجود دارند که مکانیسم قابل توجهی برای مقاومت به آمینوگلیکوزیدهاست (۶۴). سیستم های افلاکس مختلفی از خانواده

از خانواده RND⁵⁶ شناخته شده اند که مسئولیت پمپ کردن آمینوگلیکوزیدها به بیرون را قبل از رسیدن آنها به ریبوزوم بر عهده دارند.

۱-۱۰-۳ آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (AMEs)

مهمترین مکانیسم ایجاد مقاومت در ایزوله های کلینیکی هم در گرم منفی ها و هم در گرم مثبت ها تغییر آنزیماتیک گروه های آمینو یا هیدروکسیل آمینوگلیکوزیدهاست (۶۸). تغییر آنزیماتیک آمینوگلیکوزیدها در نتیجه کاهش یا از بین رفتن اتصال مولکول آمینوگلیکوزید با ریبوزوم و بروز خطا در آغاز فاز II مرحله وابسته به انرژی صورت می گیرد. آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (AMEs) را می توان در ۳ گروه طبقه بندی کرد: آمینوگلیکوزید N-استیل ترانسفراز (AACs)، آمینوگلیکوزید O-فسفوترانسفراز (APHs) و آمینوگلیکوزید O-نوکلوئیدیل ترانسفراز (ANTs).

بسیاری از AME ها منجر به ایجاد مقاومت های کلینیکی می شوند ولی بطور کلی تنها APH است که سطح بالایی از مقاومت را ایجاد می کند (۶۸).

آمینوگلیکوزیدهای مختلفی که در اینجا مورد مطالعه قرار گرفته اند به همراه مشخصات مقاومت آنتی بیوتیکی آنها در جدول (۵) آورده شده است.

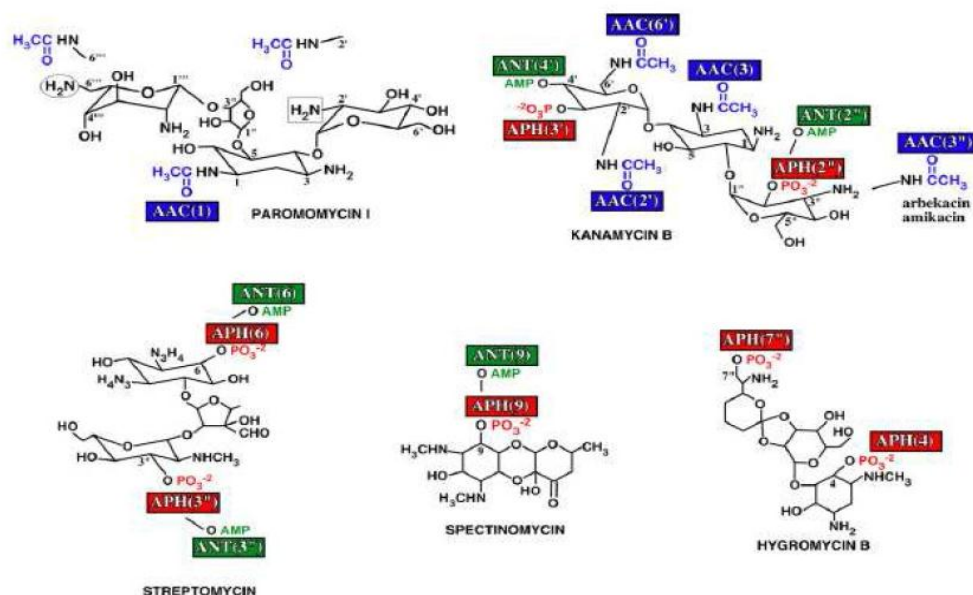
جدول ۵: آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها مورد مطالعه حاضر

AME	Subclass	Antibiotic resistance profile
AAC	AAC(6')-I	Amikacin, gentamicin C _{1a} and C ₂
	AAC(3)-Ia	Gentamicin
	AAC(3)-II	Gentamicin, netilmicin, tobramycin
ANT	ANT(2'')-Ia	Gentamicin, tobramycin, kanamycin
	ANT(4')-IIb	Amikacin, tobramycin, isepamycin

⁵⁶ Resistance-Nodulation-Division

تا به امروز، تعداد قابل توجهی از AME ها شناخته شده اند. متاسفانه در سیستم نامگذاری، اسم پروتئین ها و ژن های این آنزیم ها اختلاف نظر وجود دارد (۶۵). در این مطالعه از سیستم نامگذاری پیشنهاد شده توسط Shaw و همکارانش تبعیت شده است (۷۲). که در آن هر خانواده آنزیمی توسط یک شناسه ۳ حرفی نامگذاری می شود. هریک از خانواده ها بر اساس جایگاهی که در آن تغییر ایجاد می کنند (اعداد داخل پرانتز) به کلاس های مختلفی تقسیم می شوند که هریک از این کلاس ها در دسته های کوچک تری که تیپ آنیمی نامیده می شوند، جای می گیرند که هریک نشان دهنده یک فنوتیپ مقاومتی منحصر بفرد بوده و بوسیله اعداد رومی مشخص می شوند.

آنزیم هایی که دارای کلاس و تیپ یکسان بوده و از یک فنوتیپ هستند ولی توسط ژن های متفاوت کد می شوند را با حروف انگلیسی کوچک تمایز می کنند. بعنوان مثال: AAC(6')-Ia، N-استیل ترانسفرازی است که فرآیند استیلاسیون را در جایگاه 6' کاتالیز کرده و علیه آمیکاسین و جنتامایسین C_{1a} و C₂ مقاومت ایجاد میکند، دقیقاً مشابه AAC(6')-Ib و AAC(6')-Ic.



شکل ۱۰: جایگاه های ایجاد تغییرات توسط AAC، ANT و APH در آمینوگلیکوزیدها

۱-۱۰-۳-۱ آمینوگلیکوزید N-استیل ترانسفرازها (AACs)

آمینوگلیکوزید N-استیل ترانسفرازها (AACs) به خانواده ای از پروتئین ها تعلق دارد که شامل بیش از ۱۰۰۰۰ پروتئین است. ACC ها استیلاسیون گروه NH_2 - را در مولکول آمینوگلیکوزید کاتالیز می کنند و از استیل کو آنزیم A بعنوان دهنده استفاده می کنند. ۴ کلاس از AAC ها شناخته شده اند که استیلاسیون را در جایگاه ۱ [AAC(1)]، جایگاه ۳ [AAC(3)]، جایگاه ۲' [AAC(2')] یا جایگاه ۶' [AAC(6')] انجام می دهند (۶۵) (شکل ۹).

آنزیم های AAC(6') رایج ترین آنزیم در بین AAC ها هستند و هم در باکتری های گرم منفی و هم در باکتری های گرم مثبت وجود دارند. جایگاه ژن های کد کننده AAC(6') بر روی پلاسمیدها و کروموزوم ها و اغلب قسمتی از عناصر ژنتیکی متحرک عنوان شده است. ۲ زیرکلاس اصلی از AAC ها وجود دارد: AAC(6')-I و AAC(6')-II.

زیرکلاس AAC(6')-I بر علیه جنتامایسین C_{1a} و C_2 و آمیکاسین فعالیت می کند و احتمالا مناسب ترین استیل ترانسفراز از نظر کلینیکی می باشد. AAC(6')-II علیه هر ۳ شکل جنتامایسین (C_2 و C_{1a}) فعالیت بالایی نشان می دهد و بر روی آمیکاسین بی اثر است (۶۵). یکی از واریانت های AAC(6')-II بنام AAC(6')-Ib-cr را که بر روی فلوروکینولون ها نیز اثر دارد را می توان به عنوان زیرکلاس سوم در نظر گرفت (۳۵). AAC(6')-Ib-cr احتمالا اولین آنزیم شناخته شده ای است که توانایی انتقال مقاومت را به ۲ نوع از عوامل ضد میکروبی که یکی از آنها بطور خالص صنعتی هستند را دارا می باشد (۷۳).

کلاس AAC(3) از AAC ها شامل ۹ زیرکلاس (I-X) می باشد که تمام آنها در باکتری های گرم منفی شناسایی شده اند. زیرکلاس V بعد از تشخیص شباهتش با AAC(3)-II حذف گردید.

AAC(3)-I ۵ آنزیم AAC(3)-Ia تا AAC(3)-Ie) را دربرمی گیرد باعث ایجاد مقاومت نسبت به جنتامایسین و آمینوگلیکوزیدهای دیگر متند سیسومایسین و فورتیمیسین هستند. این آنزیم ها در بسیاری از اعضای خانواده انتروباکتریاسه و سایر ایزوله های کلینیکی گرم منفی وجود داشته و تمام آنها توسط قسمتی از کاست های ژنی موجود در ایتنگرون ها کد می شوند. AAC(3)-II از ۳ آنزیم AAC(3)-IIa، AAC(3)-IIb، و -IIC تشکیل شده اند که مسئول ایجاد مقاوت علیه جنتامایسین، نتیل مایسین، توبرامایسین، سیسومایسین و دییکاسین هستند. ژن های مربوط به آنها بر روی پلاسمیدها، بعنوان کاست های ژنی در ایتنگرون ها و گاهی به همراه ترانسپوزون ها قرار می گیرند. آنزیم های AAC(3)-II در جنس های مختلف باکتری های گرم منفی شناسایی شده اند (۶۵). سایر AAC های مهم شامل:

AAC(1) که در اشیریشیا کلی، گونه کمپیلوباکتر و در یک نوع اکتینویست یافت می شود.

AAC(2') آنزیمی است که در باکتری های گرم منفی و مایکوباکتریوم ها وجود دارد.

جایگاه قرارگیری AAC(2') بر روی کروموزوم است در حالیکه جایگاه AAC(1) تا کنون شناخته نشده است، البته جایگاه ژنی AAC(1) توسط Sanada و همکارانش (۷۴) بر روی کروموزوم عنوان شده است ولی نتیجه تا کنون مورد تایید قرار نگرفته است.

۱-۱۰-۳-۲ آمینوگلیکوزید O-نوکلئوتیدیل ترانسفرازها (ANTs)

آمینوگلیکوزیدها توسط آمینوگلیکوزید O-نوکلئوتیدیل ترانسفرازها غیرفعال می شوند از این طریق که ANT ها انتقال گروه آدنوزین مونوفسفات (AMP) را از سوبسترای دهنده یعنی آدنوزین تری فسفات (ATP) به گروه هیدروکسیل روی مولکول آمینوگلیکوزید را کاتالیز می کنند. ۵ کلاس از ANT ها وجود دارند که

آدنیلایسون را در موقعیت 6 [ANT(6)] ، 9 [ANT(9)] ، 4' [ANT(4')] ، 2'' [ANT(2'')] و 3'' [ANT(3'')] انجام می دهند.

آنزیم های ANT(3'') رایج ترین نوع آنزیم های شناخته شده از خانواده ANT هستند و حداقل ۲۲ ژن متعلق به این کلاس در بین باکتری گرم مثبت و گرم منفی شناسایی شده است. این ژن ها عامل ایجاد مقاومت نسبت به اسپکتینومایسین و استرپتومایسین بوده و بصورت کاست های ژنی قسمتی از خانواده بزرگی از اینتگرون ها، پلاسمیدها و ترانسپوزون ها را تشکیل می دهند (۶۵).

ANT(2'') در خانواده انتروباکتریاسه و باکتری های گرم منفی غیر تخمیری وجود داشته و باعث ایجاد مقاومت نسبت به جنتامایسین، توبرامایسین، کانامایسین، دیبکاسین و سیسومایسین می شود. تنها آنزیم متعلق به این کلاس ANT(2'')-Ia می باشد که زن مربوط به آن بصورت گسترده بعنوان یک کاست ژنی در کلاس ۱ و ۲ اینتگرون ها، ساختارهای پلاسمیدی و ترانسپوزونی قرار گرفته است.

ANT(4') از ۲ زیرکلاس I و II تشکیل شده است: ژن *ant(4')-I* در پلاسمیدهای باکتری گرم مثبت دیده می شود در حالیکه آنزیم های ANT(2'')-II در باکتری ها یگرم منفی وجود دارند. این آنزیم ها باعث ایجاد مقاومت نسبت به توبرامایسین، آمیکاسین و ایزپامایسین شده که در زیرکلاس (I) مقاومت نسبت به دیبکاسین نیز ایجاد می شود.

۲ آنزیم از ANT(4')-I شناسایی شده است: ANT(4'')-IIa که توسط پلاسمیدها و در سودوموناس و انتروباکتریاسه کد می شود و ANT(4'')-IIb که توسط ترانسپوزون در سودوموناس آئروژینوزا کد می شود.

آنزیم های ANT(6) بطور گسترده ای در بین باکتری های گرم مثبت وجود داشته و ناقل مقاومت نسبت به استرپتومایسین است. ژن های کدکننده ANT(6) در پلاسمیدها، ترانسپوزون ها و ایتگرون ها شناسایی شده اند.

در کلاس ANT(9) ، آنزیم شناخته شده اند که در باکتری های گرم مثبت وجود دارند و نسبت به اسپکتینومایسین مقاومت ایجاد می کنند. ژن های مربوط به این آنزیم ها روی ترانسپوزون قرار گرفته اند (۶۵).

۱-۱۰-۳ آمینوگلیکوزید O-فسفوترانسفرازها (APHs)

آمینوگلیکوزید O-فسفوترانسفرازها انتقال گروه فسفات به مولکول آمینوگلیکوزید را کاتالیز می نمایند. ۷ کلاس از این آنزیم ها در سویه های کلینیکی و ارگانسیم های تولیدکننده آمینوگلیکوزید شناسایی شده اند. گروه فسفات در موقعیت های 4 [APH(4)] ، 6 [APH(6)] ، 9 [APH(9)] ، 3' [APH(3')] ، 3'' [APH(3'')] ، 2'' [APH(2'')] و 7'' [APH(7'')] مولکول آمینوگلیکوزید قرار می گیرد (۶۵) (شکل ۱۰).

بزرگترین گروه آنزیم های APH ، کلاس APH(3') است که به ۷ زیرکلاس (I-VII) تقسیم بندی می شود. این آنزیم ها در تعدادی از باکتری های گرم منفی مختلف، باکتری های گرم مثبت و ارگانسیم های تولیدکننده آمینوگلیکوزید شناسایی شده و محل قرارگیری ژن های آنها بر روی پلاسمیدها و کروموزوم ها است. مشخصات مقاومتی آنها با توجه به اینکه در چه زیرگروهی قرار گرفته اند متفاوت است (۶۵).

هم APH(3'') و هم APH(6) باعث ایجاد مقاومت نسبت به استرپتومایسین بوده و ژن های مربوط به هر ۲ آنها بر روی کروموزوم ها، ترانسپوزون ها و پلاسمیدها قرار گرفته است. APH(4) و APH(7'') نسبت به hygromycin مقاومت ایجاد می کنند که مناسب استفاده کلینیکی نمی باشد. آنزیم های کلاس APH(9)

توسط ژن های قرار گرفته روی کروموزوم کد شده و ناقل مقاومت به استرپتومایسین هستند. در کلاس APH(2'') ، آنزیم ها علیه جنتامایسین در باکتری های گرم مثبت باعث مقاومت می شوند. این کلاس را می توان به ۴ زیرکلاس (I-IV) تقسیم کرد که ژن های مربوط به آنها بر روی پلاسمید ها و کروموزوم ها قرار گرفته اند (۶۵).

فصل دوم

اهداف و فرضیات

۱-۲ هدف اصلی^{۵۷}

تعیین فراوانی ژن های کد کننده آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (AMEs) در ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه مقاوم به این داروها جمع آوری شده از بیماران بستری در بیمارستانهای آموزشی شهرهای قزوین و تهران

۲-۲ اهداف اختصاصی^{۵۸}

۱. تعیین فراوانی ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مقاوم نسبت به داروهای آمینوگلیکوزید بکار رفته در

مطالعه

۲. تعیین فراوانی ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مقاوم نسبت به آمینوگلیکوزید به تفکیک بخش های

مختلف بیمارستان های مورد مطالعه

۳. تعیین فراوانی ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مقاوم نسبت به آمینوگلیکوزید به تفکیک نمونه های بالینی

جمع آوری شده از بیماران بستری

۴. تعیین فراوانی ژن های کد کننده آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (AMEs) شامل :

ant(4')-IIb و *ant(2'')-Ia*، *aac(3)-II*، *aac(6'')-Ib* در ایزوله های بالینی مقاوم کلبسیلا پنومونیه

به این داروها

۵. تعیین ارتباط ژنتیکی بین ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آمینوگلیکوزید جمع آوری شده از

شهرهای مورد مطالعه

⁵⁷ General Objective

⁵⁸ Specific Objectives

۳-۲ اهداف کاربردی^{۵۹}

با توجه به افزایش روز افزون مصرف آنتی بیوتیک ها در بین افراد جامعه انجام مطالعات اپیدمیولوژیک جهت تعیین نوع و درصد مقاومت میکروبی در مراکز درمانی ضروری می باشد و داشتن اطلاعاتی در مورد الگوی آنتی بیوگرام و مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری اطلاعات مفیدی را در مورد استراتژی مناسب درمانی بر علیه این عفونت ها بدست می دهد. به همین منظور این مطالعه با هدف تعیین بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان های قزوین و تهران انجام شده است.

۴-۲ فرضیه ها^{۶۰} یا سؤال های پژوهش:

۱. آیا ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آمینوگلیکوزیدها در بیمارستانهای شهر های مورد مطالعه

وجود دارد؟

۲. آیا ارتباط ژنتیکی بین ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آمینوگلیکوزیدها وجود دارد؟

۳. آیا ژنهای *aac(6')-lb*، *aac(3)-II*، *ant(2'')-la* و *ant(4')-Iib* در ایزوله های کلبسیلا

پنومونیه مقاوم به آمینوگلیکوزیدها از شیوع بالایی برخوردارند؟

⁵⁹ Applied Objectives

⁶⁰ Hypothesis

فصل سوم

بررسی متون

در مجموع مطالعات اندکی در خصوص بررسی دو تیپ ژن های مقاومت به آمینوگلیکوزید در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه در بانک های علمی معتبر وجود دارد. با این وجود مطالعاتی که در این زمینه وجود داشت به شرح زیر آمده است :

۱. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۵ در تهران توسط Eftekhar و همکارانش بر روی ۷۹ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه انجام شد، ۷۸/۵٪، ۵۳/۲٪ و ۲۰/۲٪ از نمونه ها به ترتیب به کانامایسین، جنتامایسین و آمیکاسین مقاومت نشان دادند. از نمونه ها حامل ژن های مقاومت بودند، که از این میان (۸۹/۴٪) ۴۲ نمونه دارای ژن *aac(6')-lb-cr* تشخیص داده شدند (۷۵).

۲. مطالعه ای در سال ۲۰۱۵ توسط Liang و همکارانش بر روی ۱۶۲ ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه ESBL مثبت جمع آوری شده از بیمارستان های چین انجام شد، که از این تعداد ۳۰/۲٪، ۱۹/۸٪، ۱۳/۶٪ و ۴/۳٪ به ترتیب از نظر حضور ژن های *ant (3'')-I, aac (6')-lb, aac (3)-II* و *ant (2'')-I* مثبت گزارش شدند (۷۶).

۳. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۴ توسط Peerayeh و همکاران در تهران انجام شد از مجموع ۲۰۰ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه ۵۴٪ نسبت به آمینوگلیکوزیدها مقاوم بودند. با بررسی ژن های کد کننده

آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها در این ایزوله ها مشخص شد که (۴۲/۵٪) ایزوله ها از نظر

حضور ژن *aac(6')-lb* و (۳۵/۱٪) ایزوله ها از نظر حضور ژن *aac(3)-lla* مثبت بودند (۷۷).

۴. در مطالعه ای که در توسط Chaudhary و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی ایزوله های گرم منفی

بالینی از جمله کلبسیلا پنومونیه جمع آوری شده از بیمارستان های هند انجام شد با انجام آزمون

PCR جهت شناسایی ژنهای کد کننده آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (AMEs) مشخص

شد که ۷۵/۷٪ ایزوله ها از نظر حضور این ژنها مثبت بودند. در مجموع ژنهای *ant(2)* (۱۸/۸٪) و

aph(3) (۱۰/۱٪) در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه شناسایی شدند (۷۸).

۵. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۴ توسط Almaghrabi و همکاران در ایالت پنسیلوانیای امریکا و بر

روی ۵۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه مقاوم به کاربایتم انجام شد، که ۹۸٪ این ایزوله ها از نظر حضور ژن

aac(6')-lb و تنها ۲٪ آن ها از نظر حضور ژن *ant (2'')-l* مثبت بودند. تمام ایزوله های حامل ژن

aac(6')-lb نسبت به توبرامایسین مقاوم بوده اند (۷۹).

۶. در مطالعه ای که توسط Haldorsen و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی ایزوله های کلبسیلا و

اشریشیاکلی در نروژ انجام شد در مجموع ۳۱٪ ایزوله های کلبسیلا مقاوم به جنتامایسین و یا

توبرامایسین بودند که با انجام آزمون PCR مشخص شد که ژنهای *aac(3)-II* و *aac(6')-Ib* از

شایعترین فاکتور مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزید ها گزارش شدند (۸۰).

۷. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۴ توسط Díaz PQ و همکاران در شیلی و بر روی ایزوله های کلبسیلا

پنومونیه انجام شد، به ترتیب ۴۷٪ و ۶۵٪ ایزوله ها مقاوم به آمیکاسین و جنتاماسین بودند، که ۶۹٪ این

ایزوله ها از نظر حضور ژن *aac(6')-Ib* و ۳۶٪ آن ها از نظر حضور ژن *aac(3)-IIa* مثبت بودند

(۸۱).

۸. در مطالعه ای که توسط Wang YQ همکاران در سال ۱۹۹۵ بر روی ۳۳۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه

در چین انجام شد، ۴۲٪ آن ها به جنتامایسین مقاوم بودند، که از این میان ۹۰٪ ایزوله ها از نظر حضور

ژن کدکننده آنزیم AAC (3)-V مثبت گزارش شدند (۲۸).

فصل چهارم

مواد و روش ها

۱-۴ جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری:

کلیه ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده از نمونه های بالینی ارسالی به آزمایشگاهای بیمارستانهای قدس، کوثر، رجائی، بوعلی و رازی شهر قزوین و بیمارستان های پارس، بقیه الله، فیاض بخش و هفت تیر شهر تهران می باشند.

جهت برآورد حجم نمونه از فرمول برآورد نسبت استفاده میشود. با در نظر گرفتن $\alpha=0/05$ ، شیوع گونه های مقاوم در بین نمونه های جدا شده کلبسیلا پنومونیه $P=0/50$ و دقت $0/06$ تعداد ۲۶۶ نمونه مثبت از نظر گونه کلبسیلا پنومونیه در نظر گرفته شد. ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده جهت انجام مراحل تحقیق در فریزر 0°C -۷۰ نگهداری شد.

$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 \times P \times (1 - P)}{d^2} = 266, p = 0.50, d = 0.06, 1 - \alpha = 0.95$$

نوع مطالعه توصیفی بوده و معیار ورود به مطالعه شامل:

۱- نمونه های ارسالی که از نظر رشد کلبسیلا پنومونیه مثبت باشند.

و معیار های خروج از مطالعه نیز شامل موارد زیر می باشد:

۲- نمونه های ارسالی که نتیجه کشت آن ها سایر باکتری های بجز کلبسیلا پنومونیه باشد.

۳- بیمارانی که نمونه های ارسالی آن ها تکراری باشد.

۴- نمونه های بیماران سرپایی

جدول ۶- جدول متغیرها

عنوان متغیر	مستقل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف علمی	مقیاس
			پیوسته	گسسته	اسمی	رتبه ای		
انواع ژن های <i>aac(6')-Ib</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> <i>ant(4')-Iib</i>					✓		انجام PCR و انجام الکتروفورز محصول PCR انجام الکتروفورز و بکارگیری سائز مارکرهای مربوطه و مشاهده چشمی باند	حضور دارد/ندارد
بخش بستری					✓			
نوع نمونه کلینیکی					✓			
مقاومت به فلوئوروکینولونها			✓				با استفاده از تست آنتی بیوگرام و اندازه گیری قطر هاله عدم رشد	میلی متر
حداقل غلظت مهارى جنتامایسین			✓				تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد با استفاده از روش آگار دایلوژن	میکروگرم/میلی لیتر

۴-۱-۱ جمع آوری نمونه

تعداد ۲۶۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، از بخش های مختلف بیمارستان های شهرهای قزوین و تهران از اردیبهشت ماه ۱۳۹۰ تا شهریور ۱۳۹۴ جمع آوری شدند. ایزوله های باکتریایی از نمونه های بالینی ادرار، ترشه، خون و زخم جمع آوری شدند. ابتدا نمونه های بالینی در آزمایشگاه های بیمارستان های مورد مطالعه بر روی دو محیط پایه بلاد آگار و مک کانگی آگار کشت داده شده و پس از رشد مجدداً پاساژ داده شده و به گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انتقال داده شدند. پس

از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، توسط آزمایش های میکروب شناسی و بیوشیمیایی مربوط به شناسایی گونه کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی قرار گرفتند.

۲-۴ آزمایش های تشخیصی فنوتیپی

تست های بیوشیمیایی که برای شناسایی گونه کلبسیلا پنومونیه مورد استفاده قرار گرفتند عبارتند از:

۱. کشت بر روی محیط مکانکی آگار

۲. رنگ آمیزی گرم و بررسی میکروسکوپی

۳. انجام آزمون اکسیداز

۴. کشت بر روی محیط TSI

۵. آزمایش اندول (کشت بر روی محیط SIM)

۶. آزمایش متیل رد (کشت بر روی محیط MR-VP)

۷. آزمایش ووگس پروسکوئر (کشت بر روی محیط MR-VP)

۸. آزمایش سیترات (کشت بر روی محیط سیمون سیترات)

۹. آزمایش اوره (کشت بر روی محیط اوره آگار)

۱۰. تست حرکت (کشت بر روی محیط SIM)

۱۱. آزمایش LD⁶¹

⁶¹ Lysine Decarboxylase

ایزوله های کلبسیلا پنومونیه باسیل های گرم منفی، اکسیداز منفی و لاکتوز مثبت بوده که در محیط TSI، سطح و عمق محیط را اسیدی و زرد کرده که همراه با تولید گاز می باشند. از نظر آزمون اندول و آزمون MR منفی بوده و واکنش VP و آزمون سیترات مثبت می باشند. این ارگانیزم ها از نظر آزمون LD مثبت بوده و در مجموع غیرمتحرک هستند و تست هیدرولیز اوره آنها نیز مثبت است (۲).

تجزیه قند در محیط TSI

در این محیط، پپتون، سولفات سدیم، قندهای لاکتوز، ساکارز (هر کدام ۱٪)، گلوکز (۱/۰٪) وجود دارد. این محیط به صورت شیب دار در لوله ساخته می شود. معرف اصلی در این محیط فنل رد است که در pH اسیدی زرد و در pH قلیایی قرمز خواهد بود. سویه های کلبسیلا پنومونیه به علت تخمیر قندها رنگ این محیط را زرد نموده ولی قادر به تولید H_2S نمی باشند. همچنین تولید گاز در این محیط برای اغلب سویه ها مثبت خواهد بود.

محیط اوره آز

در این محیط تولید آنزیم اوره آز توسط سویه های کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی قرار می گیرد. معرف این محیط فنل رد بوده که در صورت مثبت شدن واکنش، محیط قلیایی شده و معرف به رنگ صورتی در می آید.

محیط SIM

برای بررسی تولید H_2S^{62} ، وجود آنزیم تریپتوفاناز در باکتری و تبدیل اسید آمینه تریپتوفان به اندول⁶³ و همچنین بررسی حرکت در این سویه ها، از این محیط استفاده می شود. معرف اندول کوکس بوده که در صورت تولید اندول به رنگ قرمز در می آید. حرکت باکتری نیز در این محیط با توجه به نیمه جامد بودن محیط قابل ردیابی است.

محیط سیمون سیترات آگار⁶⁴

تنها منبع کربن در این محیط سیترات می باشد که سویه های کلبسیلا پنومونیه به علت دارا بودن آنزیم سیتراتاز، سیترات را به یکی از ترکیبات قلیایی تبدیل می کنند. معرف این محیط برموتیمول بلو بوده که در صورت واکنش، افزایش pH محیط باعث مشاهده رنگ آبی می گردد.

محیط لیزین دکربوکسیلاز

در این محیط چنانچه سویه های کلبسیلا پنومونیه آنزیم لیزین دکربوکسیلاز را تولید کنند، اسید آمینه لیزین به کاداورین⁶⁵ و CO_2 تبدیل می شود. معرف موجود در این محیط برموتیمول پرپل بوده که در صورت مثبت بودن واکنش، رنگ بنفش تیره حاصل می شود.

⁶² Sulfide

⁶³ Indol

⁶⁴ Simon Citrate Agar

⁶⁵ Codaverine

محیط متیل رد- و وگس پروسکوئر

این محیط مایع بوده که پس از تلقیح باکتری و ۲۴ ساعت گرما گذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد، آنرا در دو لوله تقسیم کرده که بتوان هر دو تست MR و VP را برای هر کدام از سویه ها انجام داد. معرف MR متیل رد بوده که در صورت مثبت بودن واکنش، بعد از اضافه کردن ۵ قطره متیل رد، رنگ صورتی تا قرمز مشاهده می شود. به لوله دیگر می توان معرف VP، ۶ قطره آلفا نفتول + ۲ قطره KOH اضافه کرد که بعد از قرار دادن آن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، در صورت انجام دکربوکسیلاسیون گلوکز و تولید محصول استیل متیل کاربینول محیط به رنگ صورتی یا قرمز مشاهده خواهد شد.

۴-۲-۱ ذخیره سازی سویه های کلبسیلا پنومونیه

بعد از تعیین هویت ایزوله ها به منظور نگهداری طولانی مدت باکتری ها، ابتدا آن ها را در ویال های حاوی محیط تریپتی کیز سوی براث^{۶۶} کشت داده و بعد از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، در صورت رشد باکتری یک یا دو قطره گلیسرول ۲۰٪ استریل به آن اضافه کرده و سپس تا زمان انجام تست های مطالعه در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۴-۲-۲ بررسی فنوتیپی حضور ژن های مقاومت در ایزوله ها در دو مرحله صورت گرفت:

الف) آزمون غربال گری آنتی بیوتیکی با روش انتشار از دیسک^{۶۷}

^{۶۶} TSB Broth

^{۶۷} Disk Diffusion Method

آزمون با متد استاندارد کربی- بوئر^{۶۸} و بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای بین المللی آزمایشگاهی (CLSI) انجام شد.

۱- محیط مولر هیتتون آگار

۲- دیسک های آنتی بیوتیکی به همراه جدول استاندارد مربوطه

۳- لوله استاندارد نیم مک فارلند^{۶۹}

۴- سوسپانسیون میکروبی

۵- سوآب و پنس استریل

۶- سرم فیزیولوژی یا نرمال سالین

۷- خط کش میلیمتری جهت اندازه گیری قطر هاله عدم رشد

برای انجام آزمون از دستور العمل CLSI به شرح زیر استفاده شد:

۱. ابتدا محیط مولر هیتتون آگار تهیه شد و pH آن بین ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم گردید. این پلیت ها، برای کنترل

آلودگی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

۲. در مرحله بعد برای انجام آزمون، ظروف حاوی دیسک های آنتی بیوتیکی آمیکاسین، کانامیسین، نتیل

مایسین، توبرامایسین و جنتامایسین، از فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد (نگهداری بلند مدت) به یخچال

۴ درجه سانتی گراد (نگهداری کوتاه مدت) انتقال داده شدند. چند دقیقه قبل از انجام تست نیز ظروف

⁶⁸ Kirby-Bauer

⁶⁹ Mac Farland

حاوی دیسک ها در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند تا به دمای اتاق برسند. دیسک های آنتی بیوتیکی از شرکت MAST انگلستان خریداری شدند.

۳. در مرحله بعد سوسپانسیون میکروبی استاندارد جهت انجام آزمون تهیه شد. از آن جا که برای تهیه سوسپانسیون، از سویه هایی که بیش از ۲۴ ساعت از کشت آن ها نگذشته باشد استفاده می شود، لذا نمونه ها یک روز قبل از انجام آنتی بیوگرام بر روی محیط ژلوز ساده کشت داده شدند. سپس در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. میزانی از کلونی را به لوله حاوی ۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل انتقال داده و بعد از مخلوط کردن با میکسر، کدورت سوسپانسیون به دست آمده با کدورت نیم مک فارلند تطبیق داده شد.

*استاندارد ۰/۵ مک فارلند :

در ابتدا استوک های اسید سولفوریک ۱٪ کلرید باریم ۱/۱۷۵٪ تهیه شد، سپس برای تهیه ۰/۵ مک فارلند (غلظت $108 \times 1/5$ بر میلی لیتر)، ۰/۰۵ میلی لیتر از کلرید باریم ۱٪ با ۹/۹۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱/۱۷۵٪ مخلوط شد. در ضمن استاندارد مورد نظر، در تاریکی و دمای اتاق، به مدت ۶ ماه پایداری دارد. از آن به عنوان استاندارد سوسپانسیون سلولی جهت آنتی بیوگرام استفاده شد. جهت تهیه نیم مک فارلند از اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۲۰ نانومتر استفاده شد است. OD نیم مک فارلند در این طول موج معادل ۰/۱ - ۰/۰۸ است.

جدول ۷- ترکیب مواد برای تهیه لوله های استاندارد نیم مک فارلند

شماره لوله	۰/۵	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
کلرید باریم ۱٪	۰/۰۵	۰/۱	۰/۲	۰/۳	۰/۴	۰/۵	۰/۶	۰/۷	۰/۸	۰/۹	۱
اسید سولفوریک ۱٪	۹/۹۵	۹/۹	۹/۸	۹/۷	۹/۶	۹/۵	۹/۴	۹/۳	۹/۲	۹/۱	۹
دانسیته سلولی $\times 10^4$	۱/۵	۳	۶	۹	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱	۲۴	۲۷	۳۰

۴. سوآب پنبه ای استریل به درون سوسپانسیون باکتریایی آماده شده غوطه ور شده و سپس بعد از فشردن سوآب به دیواره جانبی لوله آزمایش برای تخلیه مایه اضافی، بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار به صورت چمنی کشت داده و با عوض کردن زاویه کشت و چرخاندن سوآب تمامی سطح را سه بار کشت می دهیم. ۱۵ دقیقه پس از تلقیح سوسپانسیون دیسک های آنتی بیوتیکی ذکر شده که به دمای اتاق رسیده بودند، بر روی پلیت به فاصله حداقل ۲-۲/۲۵ سانتی متر از یکدیگر و همچنین از لبه پلیت جایگذاری شدند.

۵. پس از قرار دادن دیسک ها پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ سانتی گراد انکوبه شدند. سپس با استفاده از خط کش، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری و نتایج مربوطه در فرم های تهیه شده ثبت شدند.

۶. طبق دستورالعمل CLSI، ایزوله هایی که قطر هاله عدم رشد دیسک آمیکاسین ($30\mu g$) ≥ 14 میلی متر، دیسک کانامایسین ($5\mu g$) ≥ 13 میلی متر، دیسک نتیل مایسین ($5\mu g$) ≥ 12 میلی متر، دیسک

توبرامایسین ($10 \mu\text{g}$) ≥ 12 میلی متر و دیسک جنتامایسین ($5 \mu\text{g}$) ≥ 12 میلی متر باشد به عنوان

ارگانیزم مقاوم محسوب می شود.

جدول ۸- مشخصات کلی آنتی بیوتیک های استفاده شده در این مطالعه و معیارهای بررسی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی بر اساس CLSI (۲۰۱۳)

تعداد	آنتی بیوتیک	مقدار دیسک بر حسب μg	علامت اختصاری	قطر هاله مقاومت	قطر هاله حد واسط	قطر هاله حساسیت
۱	آمیکاسین	30	AK	≥ 14	۱۵-۱۶	≤ 17
۲	کانامایسین	5	K	≥ 13	۱۴-۱۷	≤ 18
۳	نتیل مایسین	5	NET	≥ 12	۱۳-۱۴	≤ 15
۴	توبرامایسین	10	TN	≥ 12	۱۳-۱۴	≤ 15
۵	جنتامایسین	5	GM	≥ 12	۱۳-۱۴	≤ 15

ب) تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) با روش آگار دایلوژن

تعیین حداقل غلظت مهاری به روش آگار دایلوژن طبق توصیه موسسه استاندارد روش های آزمایشگاهی (CLSI) برای آنتی بیوتیک جنتامایسین انجام گرفت. در این آزمون مطابق با جدول کنترل کیفی CLSI از سویه استاندارد *E.coli* ATCC 35218 برای انجام کنترل کیفی آزمایش استفاده شد. تعیین MIC با روش آگار دایلوژن برای ایزوله های غیر حساس به جنتامایسین مطابق با دستورالعمل CLSI به شکل زیر انجام و تفسیر شد.

۱. آماده کردن محلول های استوک آنتی بیوتیک

برای تعیین MIC جنتامایسین از پودر جنتامایسین (σ) با درجه خلوص ۹۸، با استفاده از فرمول های

زیر مقدار پودر مورد نیاز و حجم استوک اولیه محاسبه شد.

$$\text{Weight (mg)} = \frac{\text{volum (ml)} \times \text{consentration } (\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}})}{\text{potency} (\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}})}$$

ابتدا پودر جنتامایسین (sigma) را وزن کرده و به حجم رساندیم. در این مرحله از آب مقطر استریل به عنوان حلال و رقیق کننده استفاده شد. تعداد رقت های مورد نیاز با توجه به دستورالعمل CLSI مشخص و سریال هایی از رقت های مختلف تهیه کردیم. برای این منظور ابتدا محلول استوک جنتامایسین به غلظت ۵۱۲ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شد. بعد از استریل کردن بوسیله فیلتر، در حجم های ۱ میلی لیتری در میکروتیوپ های استریل پخش شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شده و از آن جهت ساخت محلول کاری به غلظت ۵۱۲ در زمان آزمایش استفاده شد. سپس در هنگام آزمایش از این محلول کاری رقت های کاهنده دو برابر از غلظت ۵۱۲۰۰ تا غلظت ۵۰ آماده کردیم و از آن در مرحله بعد برای تهیه پلیت های حاوی مولر هیتون آگار آنتی بیوتیک دار با غلظت ۵۱۲ تا ۰/۵ استفاده شد. کلیه مراحل کار با استفاده از وسایل استریل و تحت شرایط آسپتیک انجام گرفت.

۲. تهیه کردن پلیت های آگار حاوی آنتی بیوتیک

برای هر رقت آنتی بیوتیکی، محیط مولر هیتون آگار بر طبق دستورالعمل کارخانه سازنده آماده شد (۷/۲- pH: ۷/۴). پس از اتوکلاو و قرار دادن محیط در بن ماری با دمای ۴۵-۵۰ درجه سانتی گراد، محلول جنتامایسین در غلظت های مختلف زمانی که آگار تا دمای مورد نظر خنک شد به آگار اضافه گردید برای این منظور به هر ۹۹ میلی لیتر آگار یک میلی لیتر از محلول های آنتی بیوتیکی با غلظت های مختلف که در مرحله قبل آماده شده بود اضافه و سپس روی یک سطح صاف درون پلیت ها ریخته شد تا عمق آگار به

۳-۴ میلی لیتر رسید که بعد از خنک شدن در دمای اتاق در یخچال نگهداری شدند. برای جلوگیری از کاهش اثر آنتی بیوتیک بهتر است هر چه زودتر استفاده شود.

۳. آماده کردن سوسپانسیون میکروبی و تلقیح آن

ابتدا از نمونه ها یک سوسپانسیون میکروبی دارای کدورت معادل استاندارد نیم مک فارلند ($10^8 \times 1-2$) تهیه گردید، سپس به میزان ۱:۱۰ با سالین رقیق شد که تقریباً معادل ($10^7 \times 1$) است سپس از این سوسپانسیون باکتریایی بعد از مخلوط کردن مقدار ۲ میکرولیتر با استفاده از میکروپیپت برداشته و بر روی محیط مولر هیتون آگار قرار دادیم. تلقیح نهایی روی آگار تقریباً معادل 10^4 CFU در هر نقطه می باشد. کلیه مراحل در شرایط کاملاً آسپتیک انجام شد. بعد از تلقیح نمونه ها پلیت ها در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی گراد بمدت ۱۶-۲۰ ساعت انکوبه شد کلیه مراحل فوق بر روی یک پلیت فاقد آنتی بیوتیک بعنوان کنترل مثبت نیز انجام گرفت. هم چنین در هر پلیت خانه ای برای سویه استاندارد و کنترل منفی که تلقیح میکروبی در آن انجام نمی شود در نظر گرفته شد.

۵- تفسیر نتایج

بعد از اتمام مدت گرمخانه گذاری پلیت ها از انکوباتور خارج گشته و بر اساس رقت هایشان از رقت کم به سمت زیاد رقیق شدند. MIC هر سویه با ارزیابی رشد باکتری در نقطه تلقیح صورت گرفته و کمترین غلظت آنتی بیوتیک که مانع از رشد باکتری شده است بعنوان حداقل غلظت مهار آنتی بیوتیک مورد آزمایش در آن سویه در نظر گرفته شد. لازم بذکر است رشد تنها یک یا دو کلنی بعنوان رشد مثبت در نظر گرفته می شود.

جدول ۹: تفسیر نتایج MIC جنتامایسین

مقاوم R	حدواسط I	حساس S
$\geq 16 (\mu\text{g/ml})$	$8 (\mu\text{g/ml})$	$\leq 4 (\mu\text{g/ml})$

مطابق با جدول شماره ۹ و بر اساس CLSI ایزوله هایی که MIC آن ها کمتر یا مساوی ۴ باشد حساس، ایزوله هایی که MIC آن ها ۸ باشد حدواسط و ایزوله هایی که MIC آن ها بیشتر و یا مساوی ۱۶ باشد بعنوان مقاوم در نظر گرفته شدند.

۳-۴ جداسازی مجموعه ژن های *aac(3)-II*, *aac(6')-Ib*, *ant(4')-IIb*, *ant(2'')-Ia*, *aac(3)-Ia*

برای تعیین فراوانی ژن های کد کننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، *ant(4')-IIb*, *ant(2'')-Ia*,

aac(3)-Ia, *aac(3)-II*, *aac(6')-Ib* از پرایمر های اختصاصی مطابق جدول ۱۰ استفاده شد، که با تکثیر ژن مورد نظر با شرایطی که گفته خواهد شد و نهایتاً الکتروفورز محصولات بر روی ژل آگارز حضور یا عدم حضور آن ها مشخص گردید. در آزمون PCR از ایزوله های تأیید شده کد کننده ژنهای مقاومت به آمینوگلیکوزیدها موجود در گروه، پس از تعیین توالی به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

۱-۳-۴ مراحل انجام آزمون ملکولی عبارتند از:

۶- استخراج DNA

۷- آماده سازی پرایمرها

۸- انجام آزمون PCR

۹- الکتروفورز

جدول ۱۰: پرایمرهای مورد استفاده در آزمون PCR جهت جداسازی ژن های آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (AMEs)

منبع	سایز (bp)	توالی الیگونوکلئیدی	پرایمر	ژن
۸۰	482	5- TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA -3 5- CTCGAATGCCTGGCGTGTTT -3	aac(6')-Ib -F aac(6')-Ib -R	<i>aac(6')-Ib</i>
۸۰	370	5- TGAAACGCTGACGGAGCCTC -3 5- GTCGAACAGGTAGCACTGAG -3	aac(3)-II -F aac(3)-II -R	<i>aac(3)-II</i>
۸۰	465	5- ATGGGCATCATTCGCACATGTAGG -3 5- TTAGGTGGCGGTACTTGGGTC -3	aac(3)-Ia -F aac(3)-Ia -R	<i>aac(3)-Ia</i>
۸۰	535	5- ATGGACACAACGCAGGTCGC -3 5- TTAGGCCGCATATCGCGACC -3	ant(2'')-Ia -F ant(2'')-Ia -R	<i>ant(2'')-Ia</i>
۸۰	364	5- TATCTCGGCGGCGGTTCGAGT -3 5- CACGCGGGGAAACGCGAGAA -3	ant(4')-IIb -F ant(4')-IIb -R	<i>ant(4')-IIb</i>

۴-۳-۱-۱ استخراج DNA:

مواد و وسایل مورد نیاز

- سمپلر و سر سمپلر
- میکروتیوب ۱/۵
- شیکر ۷۰
- میکروسانتریفیوژ
- انکوباتور ۳۷ درجه
- بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی گراد

- نانودراپ

- آب مقطر استریل

مراحل استخراج DNA با استفاده از روش boiling به شرح ذیل انجام گرفت:

۱. برای استخراج DNA به روش boiling نیاز به کلنی هایی از کشت تازه (۲۴ ساعته) داریم، به این

منظور نمونه هایی که در آزمون فنوتیپی به هر یک از آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید مقاوم بودند،

برای استخراج DNA کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد

و رشد ایزوله های مورد نظر آماده استخراج شدند.

۲. ابتدا ۳ تا ۵ کلنی از هر نمونه را داخل ویال اپندورف ۱/۵ میلی لیتر حاوی ۲۰۰ μ l آب مقطر استریل

حل کردیم.

۳. با استفاده از شیکر آن قدر نمونه ها را shake می کنیم تا اینکه کاملاً حل شوند.

۴. ویال ها را به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه، داخل بن ماری جوش (۱۰۰ درجه سانتی گراد)، قرار دادیم به طوری

که سطح آب جوش دو سوم ویال را در بر گیرد.

۵. سپس ویال ها را به مدت ۱۰-۵ دقیقه، با دور ۱۴۰۰۰ g (با استفاده از سانتریفوژ اپندورف)، سانتریفوژ

کردیم و محلول رویی (سوپرناتانت) ویال ها که حاوی DNA می باشد، برای انجام واکنش PCR

به اپندورف استریل منتقل شد.



شکل ۱۱: دستگاه میکروسانتریفوژ مورد استفاده در مطالعه حاضر

۶. در این مرحله پس از استخراج، برای اطمینان از وجود DNA توتال، از دستگاه نانودراپ در دو طول موج ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر استفاده شد.

۷. استخراج به این روش به صورت روزانه انجام گرفت و برای حصول به نتایج بهتر در PCR، DNA استخراج شده ذخیره نمی شد.

۴-۳-۱-۲ آماده سازی پرایمر ها

۱- ابتدا توالی پرایمر های مورد استفاده جهت ساخت تحویل شرکت دانمارکی شد. پرایمرها پس از طراحی به صورت لیوفیلیزه دریافت شدند. برای تهیه محلول ذخیره بر طبق دستورالعمل (برگه آنالیز) همراه پرایمر عمل شد.

۲- در مرحله بعد ویال های حاوی پرایمر، به مدت ۰/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

۳- محلول استوک پرایمر $100 \mu\text{mol}$ تهیه و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۴- برای انجام کار روزانه، محلول پرایمر با غلظت $10 \mu\text{mol}$ از هر دو رشته فوروارد و ریورس تهیه و برای هر سری از واکنش های PCR استفاده شد.

۴-۳-۱-۳-۳-۳: PCR انجام آزمون

الف- مواد و وسایل موردنیاز

ترموسایکلر (Applied biosystems ساخت کشور آمریکا)

میکروسانتریفیوژ

میکروتیوب ۱/۵ و ۰/۲

سمپلر و سر سمپلر

شیکر

پرایمر

آب دیونیزه استریل

MgCl_2

PCR buffer

dNTP

Taq polymerase

DNA template

ب- آماده سازی Mastermix

در این مرحله ابتدا Mastermix تهیه شد (جدول ۱۱). تمام مواد مورد نیاز برای ساخت Mastermix از شرکت ژن فن آوران تهیه شدند. سپس با استفاده از پرایمر های اختصاصی تکثیر و شناسایی ژن های مورد نظر صورت گرفت. برای انجام واکنش های PCR، حجم نهایی هر واکنش ۲۵ میکرولیتر بود. برای به دست آوردن بهترین مقدار ترکیبات مورد استفاده (مثل $MgCl_2$ یا پرایمر)، گرادیانی از مقادیر مختلف این ترکیبات، طی چند واکنش مختلف PCR انجام شد.

جدول ۱۱: مقادیر بهینه برای تهیه Mastermix واکنش PCR

ترکیب	حجم (میکرولیتر)
dNTP mix 10 mmol	2
PCR Buffer 10X	10
$MgCl_2$ 50 mmol	3
d.H ₂ O	73

ج- آماده سازی واکنش PCR:

با در نظر گرفتن حجم نهایی هر واکنش PCR که ۲۵ میکرولیتر بود، حجم پرایمر ها، DNA الگو و میزان آنزیم پلیمرز که باید به Mastermix اضافه شوند به شرح ذیل در جدول (۱۲) آمده است:

جدول ۱۲: مواد ملکولی مورد نیاز جهت انجام یک واکنش PCR

ترکیب	حجم (میکرولیتتر)
Mastermix	21.75
DNA Template	1
Primer F	1
Primer R	1
Taq pol 5 u/μl	0.25

د- برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر^{۷۱}:

پس از قرار دادن ویال ها در دستگاه ترموسایکلر، شرایط دمایی مختلف و زمان های آن ها در یک واکنش PCR برای ژنوتیپ های مورد نظر که در جدول (۱۳) ذکر شده اجرا گردید.

جدول ۱۳: شرایط برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر درواکنش PCR برای ژن های مورد نظر

ژن	initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	final extension
<i>aac(6')-Ib</i>	95°C for 5min	95°C for 1min	55°C for 1min	72°C for 1min	72°C for 10min
<i>aac(3)-II</i>	95°C for 5min	95°C for 1min	57°C for 1min	72°C for 1min	72°C for 10min
<i>ant(2'')-Ia</i>	95°C for 5min	95°C for 1min	56°C for 1min	72°C for 1min	72°C for 10min
<i>ant(4')-IIb</i>	95°C for 5min	95°C for 1min	59°C for 1min	72°C for 1min	72°C for 10min

⁷¹ Thermocycler



شکل ۱۲: دستگاه ترموسایکلر Applied biosystems (ساخت کشور امریکا) استفاده شده در مطالعه حاضر

۴-۳-۱-۴ الکتروفورز محصولات PCR:

مواد و وسائل مورد نیاز

- پودر آگارز^{۷۲}
- بافر TBE^{۷۳} 1X
- Loading Buffer (Fermentase)
- Marker (Ladder) (Fermentase)
- سینی ژل^{۷۴}

^{۷۲} Agarose

^{۷۳} Tris-HCl Boric Acid EDTA

^{۷۴} Gel Tray

- شانه ژل^{۷۵}
- تانک الکتروفورز^{۷۶}
- منبع تغذیه الکتریکی^{۷۷}
- سمپلر و سرسمپلر^{۷۸}

تهیه بافر TBE 1X

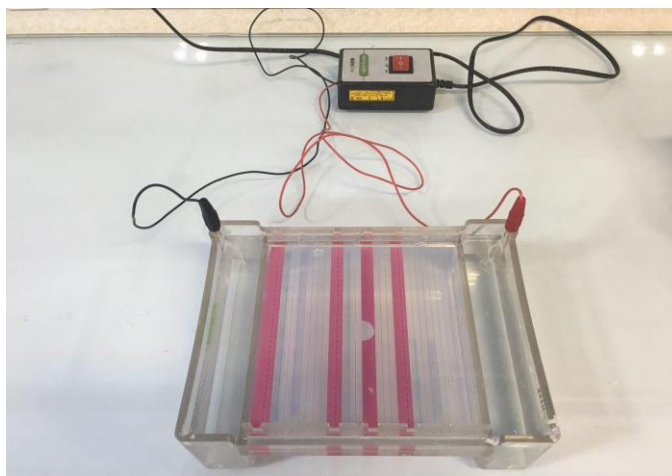
برای تهیه بافر TBE 10X (ضمیمه ۱)، مواد مندرج در ضمیمه با مقادیر مربوطه مخلوط کرده و حجم نهایی محلول به ۱ لیتر رسانده شد. سپس بافر 1X TBE (ضمیمه ۳ و ۲) از بافر 10X تهیه و از آن در تانک الکتروفورز و تهیه ژل استفاده گردید.

الکتروفورز

برای انجام الکتروفورز محصولات PCR از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. میزان ۱ گرم پودر آگارز را در 100 میلی لیتر بافر TBE 1X حل کرده و بعد از حرارت دادن و خنک شدن به میزان ۱ میکرولیتر (10µg/ml) ایتیدیوم بروماید (برای رنگ آمیزی DNA) به آن اضافه کردیم. پس از مخلوط کردن، محلول را داخل قالب ریخته و پس از بسته شدن ژل، آن را از قالب خارج کرده و به داخل تانک الکتروفورز انتقال دادیم. مقدار هفت میکرولیتر از محصول PCR را با سه میکرولیتر Loading Buffer 6X مخلوط کرده و داخل چاهک های ژل برای الکتروفورز قرار دادیم. برای انجام الکتروفورز، ولتاژ روی ۱۰۰ ولت تنظیم گردید، وقتی نمونه سه چهارم

⁷⁵ Gel Comb
⁷⁶ Electrophoresis Tank
⁷⁷ Power supply
⁷⁸ Tip

طول ژل را طی کرد، ژل را از تانک خارج و با لامپ UV مشاهده شد. در صورت مناسب بودن باند های حاصل از الکتروفورز، ژل را با دستگاه UVP مورد مشاهده قرار داده و از ژل مربوطه عکس تهیه کردیم.



شکل ۱۳: تانک الکتروفورز مورد استفاده در مطالعه حاضر



شکل ۱۴: دستگاه Gel-Documentation مورد استفاده در مطالعه حاضر

ERIC – PCR ۴-۴

همه ایزوله های مولد AMEs با استفاده از پرایمر های اختصاصی (جدول ۱۴) به روش ^{۷۹}ERIC-PCR بررسی شدند.

جدول ۱۴: پرایمرهای بکار رفته جهت انجام ERIC-PCR

منبع	ERIC1R	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3	پرایمر های ERIC-PCR
۸۳	ERIC2	5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3	

جدول ۱۵: برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت انجام ERIC-PCR

ژن	initial denaturation	denaturation	annealing	Extension	final extension
<i>ERIC</i>	94°C for 10 min	94°C for 1 min	45°C for 1 min	72°C for 2 min	72°C for 16 min

⁷⁹ Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR

فصل پنجم

نتایج و یافته ها

۱-۵ ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به تفکیک شهر و بیمارستان

طی مدت زمان اردیبهشت ماه ۱۳۹۰ تا شهریور ماه ۱۳۹۴ تعداد ۲۶۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه دریافت شده از آزمایشگاه های بیمارستان های شهرهای قزوین (قدس، کوثر، بوعلی، رجائی و رازی) و تهران (فیاض بخش، هفت تیر، بقیه الله و پارس) جمع آوری و مجدداً در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی با انجام آزمایشات میکروب شناسی و بیوشیمیایی مورد تأیید قرار گرفتند. تعداد نمونه ها به تفکیک شهر و بیمارستان ها به ترتیب در جداول (۱۸، ۱۷، ۱۶) آمده است.



شکل ۱۵: نتیجه تست های بیوشیمیایی انجام شده در مطالعه حاضر

جدول ۱۶: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به تفکیک شهرهای مورد مطالعه

شهر	تعداد ایزوله ها	درصد
قزوین	۲۱۴	۸۰/۴
تهران	۵۲	۱۹/۶
مجموع	۲۶۶	۱۰۰

جدول ۱۷: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به تفکیک بیمارستان های شهر قزوین

بیمارستان	تعداد ایزوله	درصد
کوثر	۷۴	۲۷/۸
قدس	۵۷	۲۱/۴
رازی	۵۴	۲۰/۳
بوعلی	۱۹	۷/۱
رجائی	۱۰	۳/۸
مجموع	۲۱۴	۸۰/۴

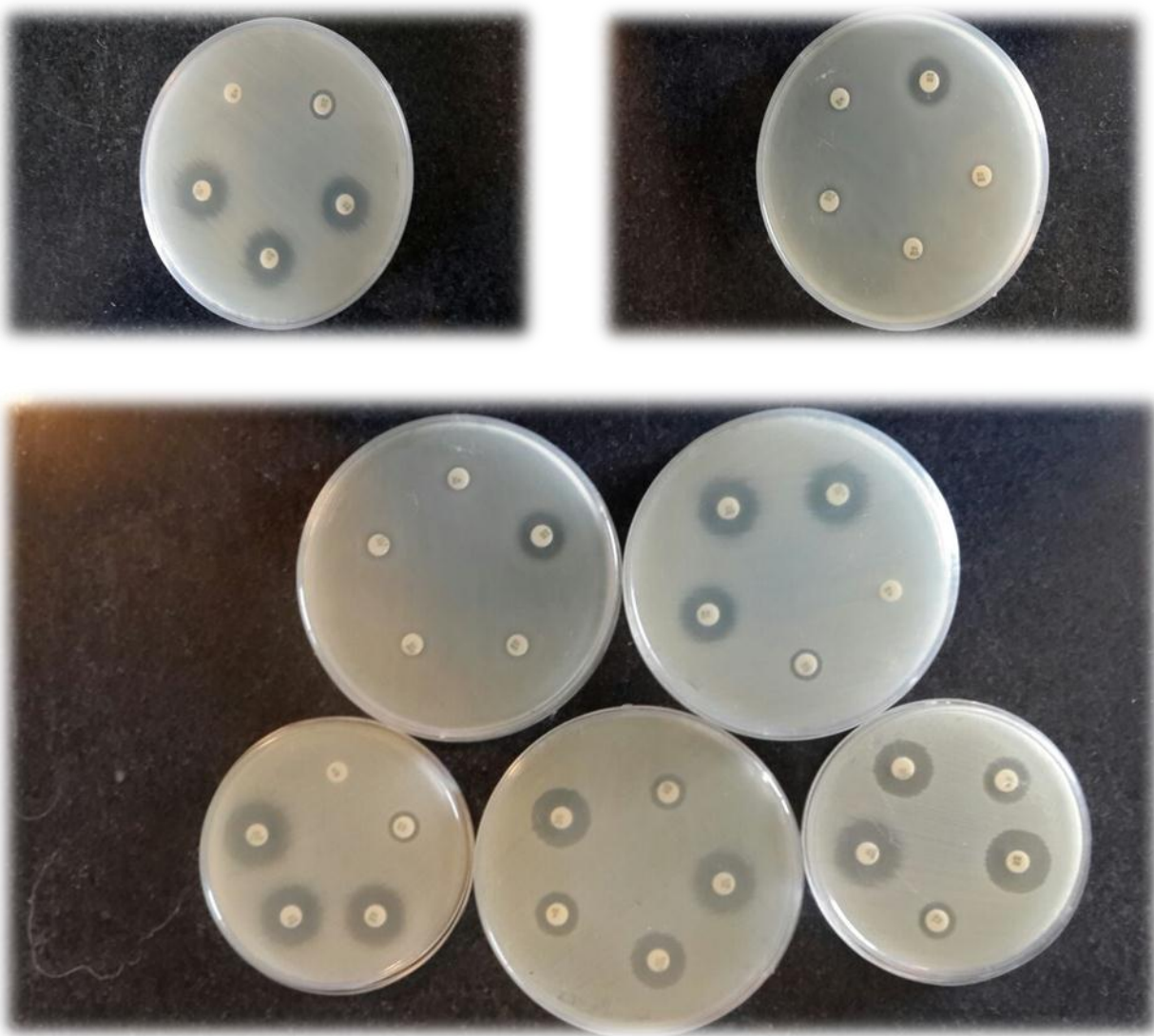
جدول ۱۸: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به تفکیک بیمارستان های شهر تهران

بیمارستان	تعداد ایزوله	درصد %
فیاض بخش	۲۸	۱۰/۵
هفت تیر	۱۳	۴/۹
بقیه الله	۶	۲/۳
پارس	۵	۱/۹
مجموع	۵۲	۱۹/۶

۲-۵ بررسی فنوتیپی وجود ایزوله های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها

۱-۲-۵ تست غربالگری آنتی بیوتیکی

در مجموع از بین ۲۶۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه بعد از انجام تست غربالگری ، ۱۷۲ ایزوله (۶۴/۶٪) کاهش حساسیت نسبت به یکی از آنتی بیوتیک های مورد استفاده در تست غربالگری نشان دادند، که از این میان ۲۱۴ ایزوله (۸۰/۴٪) مربوط به شهر قزوین و ۵۲ ایزوله (۱۹/۶٪) مربوط به شهر تهران می باشد. همانطور که در جدول (۱۹) آمده است، بیشترین میزان مقاومت نسبت به کانامایسین ۷۰/۵٪ ، تویرامایسین با ۵۱/۲٪ و جتتامایسین با ۴۷/۶٪ می باشد و پس از آن به ترتیب نتیل مایسین با ۳۷٪ و آمیکاسین با ۳۲/۲٪ قرار دارند.



شکل ۱۶: نتایج بدست آمده از ارزیابی فنوتیپی مقاومت به آنتی بیوتیک ها به روش دیسک دیفیوژن آگار

جدول ۱۹: میزان مقاومت ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به آنتی بیوتیک های مرحله غربالگری

آنتی بیوتیک	تعداد ایزوله های مقاوم	درصد
کانامایسین	۱۷۹	۷۰/۵
توبرامایسین	۱۳۰	۵۱/۲
جتنامایسین	۱۲۱	۴۷/۶
نتیل مایسین	۹۴	۳۷
آمیکاسین	۸۲	۳۲/۲

جدول ۲۰: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیر حساس به آمینوگلیکوزید به تفکیک شهر

شهر	تعداد ایزوله ها	درصد
قزوین	۱۳۲	۷۶/۷
تهران	۴۰	۲۳/۳
مجموع	۱۷۲	۱۰۰

جدول ۲۱: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیر حساس به آمینوگلیکوزید به تفکیک بیمارستان های شهرقزوین

بیمارستان	تعداد ایزوله	درصد
کوثر	۳۷	۲۱/۵
رازی	۴۲	۲۴/۴
قدس	۳۳	۱۹/۲
بوعلی	۱۴	۸/۱
رجائی	۶	۳/۵
مجموع	۱۳۲	۷۶/۷

جدول ۲۲: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیر حساس به آمینوگلیکوزید به تفکیک بیمارستان های شهر تهران

بیمارستان	تعداد ایزوله	درصد
فیاض بخش	۲۵	۱۴/۵
هفت تیر	۸	۴/۷
پارس	۴	۲/۳
بقیه الله	۳	۱/۷
مجموع	۴۰	۲۳/۳

جدول ۲۳: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیر حساس به آمینوگلیکوزید به تفکیک نوع نمونه

نوع نمونه	تعداد ایزوله	در صد
ادرار	۸۹	۵۱/۷
تراشه	۴۲	۲۴/۴
زخم	۱۳	۷/۶
خون	۲۸	۱۶/۳
مجموع	۱۷۲	۱۰۰

جدول ۲۴: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیر حساس به آمینوگلیکوزید به تفکیک بخش های مختلف بیمارستانی

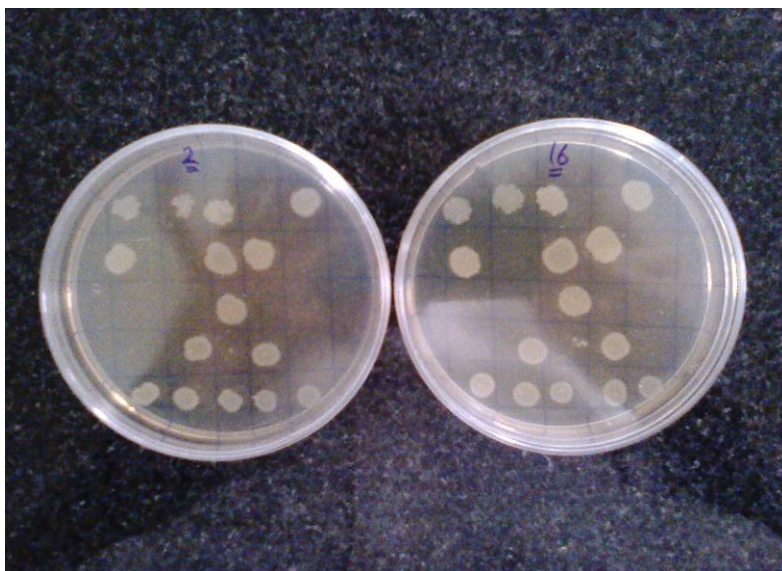
بخش	تعداد ایزوله	درصد
مراقبت های ویژه	۷۹	۴۵/۹٪
داخلی	۵۵	۳۲٪
عفونی	۳۸	۲۲/۱٪
مجموع	۱۷۲	۱۰۰٪

جدول ۲۵: تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیر حساس به آمینوگلیکوزید به تفکیک جنس

جنس	تعداد ایزوله	درصد
زن	۱۱۵	۶۶/۹
مرد	۵۷	۳۳/۱

جدول ۲۶: نتایج MIC برای ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیر حساس به جنتامایسین

غلظت آنتی بیوتیک	تعداد ایزوله ها	در صد
۱	۰	۰
۲	۲	۱/۶
۴	۵	۳/۹
۸	۸	۶/۳
۱۶	۱۳	۱۰/۲
۳۲	۱۲	۹/۴
۶۴	۳۲	۲۵/۲
۱۲۸	۴۲	۳۳/۱
۲۵۶	۱۰	۷/۹
۵۱۲	۳	۲/۴
مجموع	۱۲۷	۱۰۰



شکل ۱۷: نتایج MIC برای ایزوله های غیر حساس به جنتامایسین

۳-۵ نتایج جداسازی ژن های AME

با انجام آزمون PCR بر روی ایزوله های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها فراوانی ژن های دخیل در مقاومت سنجیده شد (جدول ۲۷). همانطور که در جدول ۲۷ آمده است *aac(6')-lb* بیشترین فراوانی را در بین ژن های مسئول مقاومت به خود اختصاص داده است و پس از آن ژن *aac(3)-II* قرار دارد. در این مطالعه ۱۳۴ (۷۸٪) ایزوله بطور مشترک دارای ژن های *aac(3)-II* و *aac(6')-lb* بودند. در این مطالعه ژن های *ant(2'')-la* و *ant(4')-IIb* یافت نشدند. همچنین همانگونه که در جدول ۲۸ آمده است فراوانی ژن های AME در بخش مراقبت های ویژه از میزان بالاتری (۴۵/۹٪) نسبت به دیگر بخش ها برخوردار بوده است. شکل های ۱۸ و ۱۹ به ترتیب نتایج الکتروفورز ژن های *aac(3)-II* و *aac(6')-lb* را نشان می دهد.

جدول ۲۷: فراوانی ژن های آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (AMEs) در مطالعه حاضر

ژن های کد کننده AME	تعداد ایزوله ها	درصد
<i>aac(6')-Ib + aac(3)-II</i>	۱۳۴	۷۷/۹
<i>aac(6')-Ib</i>	۲۵	۱۴/۵
<i>aac(3)-II</i>	۳	۱/۷
<i>aac(3)-Ia</i>	۰	۰
<i>ant(2'')-Ia</i>	۰	۰
<i>ant(4')-IIb</i>	۰	۰
None of AMEs	۱۰	۵/۸
مجموع	۱۷۲	۱۰۰

جدول ۲۸: فراوانی ژن های *aac(3)-II* و *aac(6')-Ib* در ایزوله های کلیسیلا پنومونیه غیرحساس به آمینوگلیکوزید جدا شده از بخش های مختلف بیمارستان

ژن های کد کننده AME	مراقبت های ویژه (درصد) تعداد	داخلی (درصد) تعداد	عفونی (درصد) تعداد	مجموع (درصد) تعداد
<i>aac(6')-Ib + aac(3)-II</i>	۶۶(۳۸/۴)	۴۳(۲۵)	۲۵(۱۴/۵)	۱۳۴(۷۷/۹)
<i>aac(6')-Ib</i>	۸(۴/۷)	۸(۴/۷)	۹(۵/۲)	۲۵(۱۴/۵)
<i>aac(3)-II</i>	۱(۰/۶)	۲(۱/۲)	–	۳(۱/۷)
None of AMEs	۴(۲/۳)	۲(۱/۲)	۴(۲/۳)	۱۰(۵/۸)
مجموع	۷۹(۴۵/۹)	۵۵(۳۲)	۳۸(۲۲/۱)	۱۷۲(۱۰۰)

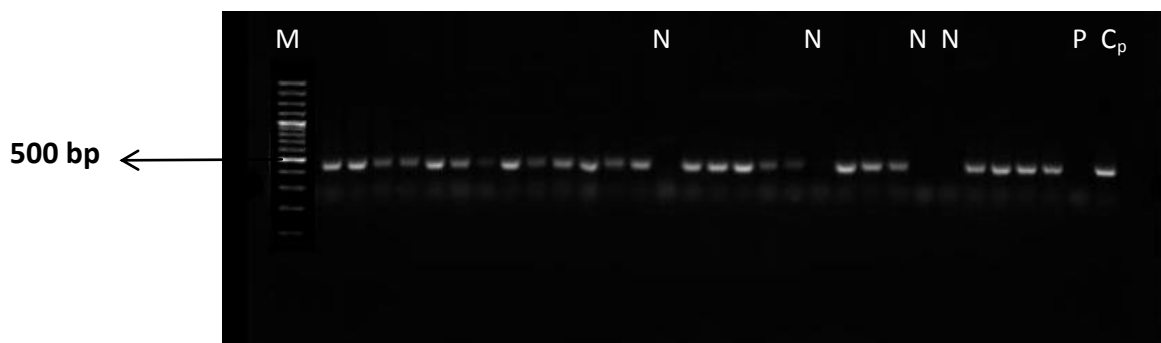
جدول ۲۹: فراوانی ژن های *aac(3)-II* و *aac(6')-Ib* در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیرحساس به آمینوگلیکوزید جدا شده از نمونه های مختلف بیمارستانی

ژن های کدکننده AME	ادرار (درصد) تعداد	زخم (درصد) تعداد	تراشه (درصد) تعداد	خون (درصد) تعداد	مجموع (درصد) تعداد
<i>aac(6')-Ib + aac(3)-II</i>	۷۱(۴۱/۳)	۶(۳/۵)	۳۸(۲۲/۱)	۱۹(۱۱)	۱۳۴(۷۷/۹)
<i>aac(6')-Ib</i>	۱۱(۶/۴)	۵(۲/۹)	۳(۱/۷)	۶(۳/۵)	۲۵(۱۴/۵)
<i>aac(3)-II</i>	۲(۱/۲)	–	۱(۰/۶)	–	۳(۱/۷)
None of AMEs	۵(۲/۹)	۲(۱/۲)	–	۳(۱/۷)	۱۰(۵/۸)
مجموع	۸۹(۵۱/۷)	۱۳(۷/۶)	۴۲(۲۴/۴)	۲۸(۱۶/۳)	۱۷۲(۱۰۰)

۴-۵ یافته های آزمون مولکولی

ژن *aac(6')-Ib*

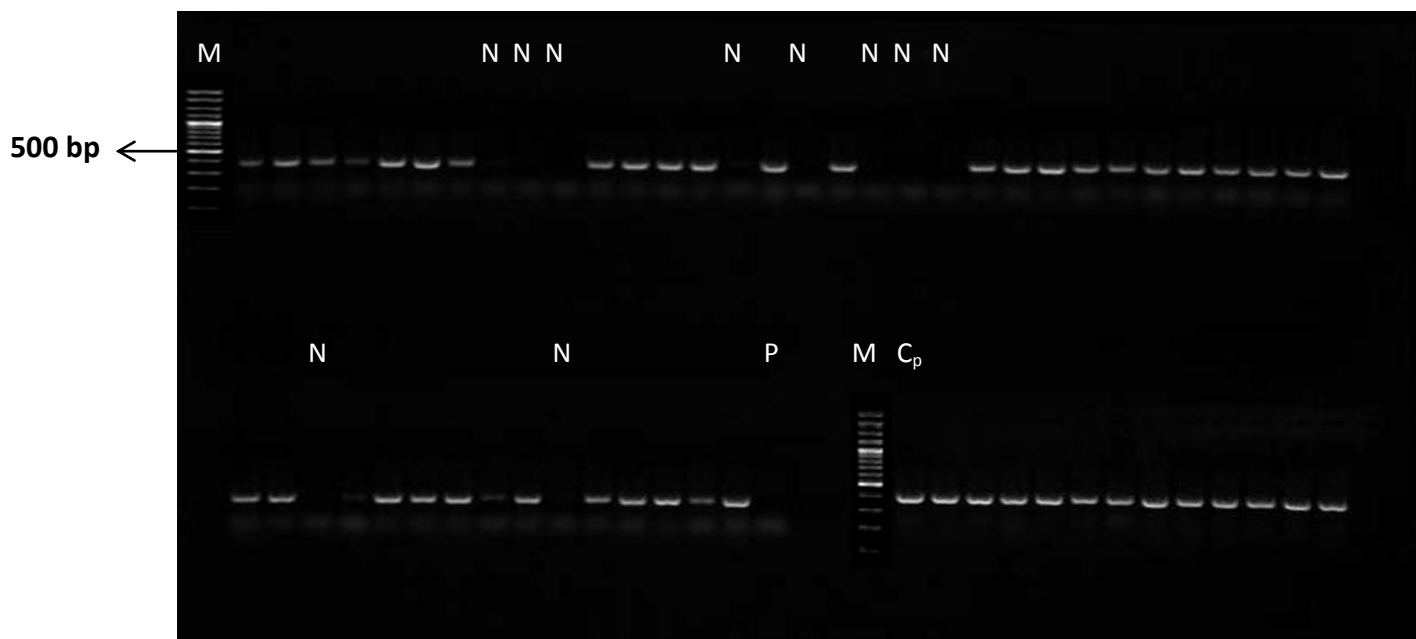
تمامی ایزوله هایی که در روش دیسک دیفیوژن به آمینوگلیکوزیدها مقاوم بودند با آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از نظر حضور ژن *aac(6')-Ib* مورد بررسی قرار گرفتند که 159 (92٪) ایزوله دارای این ژن بودند (شکل ۱۸).



شکل ۱۸- نتایج ژل الکتروفورز ژن *aac(6')-lb* - سایز باند: ۴۸۲ جفت باز؛ ستون M: DNA مارکر؛ ستون Cp: کنترل مثبت؛ ستون های N: نمونه بالینی منفی؛ ستون P: واکنش PCR بدون DNA الگو؛ سایر ستون ها: نمونه بالینی مثبت

ژن *aac(3)-II*

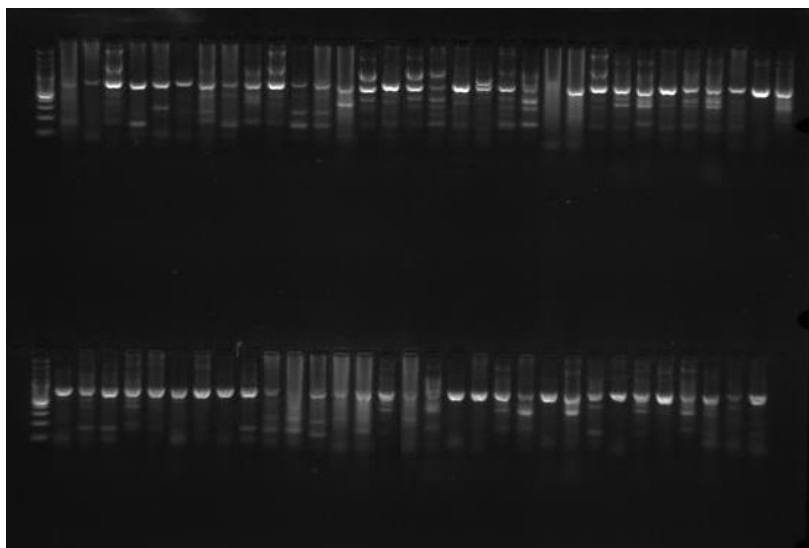
تمامی ایزوله هایی که در روش دیسک دیفیوژن به کوئینولون ها مقاوم بودند با آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از نظر حضور ژن *aac(3)-II* مورد بررسی قرار گرفتند که 137 (80٪) ایزوله دارای این ژن بودند (شکل ۱۹).



شکل ۱۹- نتایج ژل الکتروفورز ژن *aac(3)-II* - سایز باند: ۳۷۰ جفت باز؛ ستون M: DNA مارکر؛ ستون Cp: کنترل مثبت؛ ستون های N: نمونه بالینی منفی؛ ستون P: واکنش PCR بدون DNA الگو؛ سایر ستون ها: نمونه بالینی مثبت

۵-۵ یافته های ERIC-PCR

بررسی نتایج آزمون ERIC-PCR نشان داد که در مجموع ۵۰٪ ایزوله های مقاوم به آمینوگلیکوزید در این مطالعه متعلق به ۳ کلون متمایز شامل A (۴۵-٪/۲۶)، B (۲۴-٪/۱۴/۵) و C (۱۷-٪/۵/۹) بودند. (۸۶-٪/۵۰) دیگر ایزوله ها دارای ژنوتیپ Independent بوده، به این معنا که هریک الگوی بانندی منحصر به خود داشتند.



شکل ۲۰- نتایج ژل الکتروفورز ERIC-PCR

جدول ۳۰: توزیع فراوانی ژن های *aac(6')-Ib* و *aac(3)-II* در کلون های مختلف

مجموع	Independent	Type C	Type B	Type A	ژن های کدکننده AME
(درصد) تعداد	(درصد) تعداد	(درصد) تعداد	(درصد) تعداد	(درصد) تعداد	
۱۳۴(۷۷/۹)	۶۸(۳۹/۵)	۱۳(۷/۶)	۲۰(۱۱/۶)	۳۳(۱۹/۲)	<i>aac(6')-Ib + aac(3)-II</i>
۲۵(۱۴/۵)	۱۳(۷/۶)	۴(۲/۳)	۲(۱/۲)	۶(۳/۵)	<i>aac(6')-Ib</i>
۳(۱/۷)	۲(۱/۲)	—	—	۱(۰/۶)	<i>aac(3)-II</i>
۱۰(۵/۸)	۳(۱/۷)	—	۲(۱/۲)	۵(۲/۹)	None of AMEs
۱۷۲(۱۰۰)	۸۶(۵۰)	۱۷(۹/۹)	۲۴(۱۴)	۴۵(۲۶/۲)	مجموع

در ادامه با بررسی حضور ژن های جداسازی شده در کلون های مختلف مشخص شد که ژن *aac(6')-Ib* بیشترین فراوانی (۸۱-۴۷/۱٪) را از بین ایزوله های با الگوی Independent به خود اختصاص داده است.

فصل ششم

بحث و پیشنهادات

۶-۱ بحث:

کلبسیلا پنومونیه جزئی از میکروفلور طبیعی بدن انسان را تشکیل می دهد و حدود یک سوم افراد، ناقل روده ای این میکروب هستند. میزان استقرار این باکتریها در بیماران بستری شده در بیمارستان بیشتر از بیماران سرپایی می باشد. آنها عامل طیف وسیعی از عفونت ها شامل سپتی سمی، پنومونی، عفونت مجاری ادراری، مننژیت و آبسه های چرکی در اندام های مختلف به خصوص آبسه های کبدی هستند (۸۵،۸۴). قابلیت باکتری کلبسیلا پنومونیه در ایجاد بیماری به علت کاسته شدن دفاع میزبان در نتیجه اعمال جراحی پیچیده و طولانی و نیز مصرف داروهای متفاوت رو به ازدیاد می باشد (۸۶). آنچه در مورد این باکتری بیشتر جلب توجه می کند، مقاومت بالای آن به آنتی بیوتیک های مختلف و گسترش سریع آنها در بخش های مختلف به خصوص در بخش نوزادان می باشد که سبب سپتی سمی و مرگ و میر بالا می گردند (۸۸،۸۷).

متأسفانه مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها (از جمله بتالاکتام، فلوروکینولونها و آمینوگلیکوزیدها) در دهه های اخیر باعث افزایش ظهور این سویه های مقاوم شده است (۹۰،۸۹). امروزه ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مقاومت چندگانه ای را نسبت به برخی از آنتی بیوتیک ها از جمله آمینوگلیکوزیدها نشان می دهند. اهمیت بالینی آمینوگلیکوزیدها از آن نظر است که بر علیه طیف وسیعی از باکتری های هوازی به ویژه باکتری های گرم منفی، بسیاری از استافیلوکوک ها^{۸۰} و برخی استرپتوکوک ها^{۸۱} مؤثر است و بیشترین کاربرد را در درمان عفونت های ناشی از باسیل های گرم منفی هوازی و بی هوازی اختیاری نشان می دهد (۶۸). مقاومت اکتسابی به آمینوگلیکوزیدها هم در باکتری های گرم منفی و هم در باکتری های گرم مثبت گزارش شده است. مکانیسم

⁸⁰ Staphylococcus

⁸¹ Streptococcus

های متفاوتی شامل تغییر در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو، کاهش در نفوذپذیری دارو، پمپ افلاکس، تغییر 16SrRNA به واسطه متیلازها و آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (AMEs) مسئول مقاومت به آمینوگلیکوزیدها هستند (۹۱,۶۵). از این بین غیرفعال سازی آنزیماتیک آمینوگلیکوزیدها توسط آنزیم های تغیردهنده آن ها، اصلی ترین مکانیسم مقاومت به این داروها درباکتری های گرم منفی است. مقاومت ایجاد شده توسط آنزیم برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ متعاقب شیوع مقاومت به آمیکاسین در ایزوله های گرم منفی مشاهده شد که اولین گزارش مربوط به ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا بوده است ولی تا سال ۱۹۸۴ در بین گونه های اشیریشیا کلی،سیترو باکتر،کلبسیلا و سراشیا نیز گسترش پیدا کرد(۷۲). بطور قابل ملاحظه ای ۷۰/۵٪ و ۵۱/۲٪ از ایزوله ها مقاومت کامل و حد واسط به کانامایسین و توبرامایسین داشتند. این یافته ها اگرچه به یافته های مطالعه قبلی در ایران نزدیک است اما همچنان میزان پایین تری از مقاوت را نشان میدهد. افتخار و همکارانش میزان مقاومت کلبسیلا پنومونیه نمونه های ادرار را نسبت به کانامایسین و جتتامایسین ۷۸/۵٪ و ۵۳/۲٪ گزارش کردند (۷۵). در مطالعه دیگری در ایران، که در سال ۲۰۱۴ توسط پیرایه و همکاران در تهران انجام شد از مجموع ۲۰۰ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه ۱۰۸ ایزوله (۵۴٪) نسبت به آمینوگلیکوزیدها مقاوم بودند، که به ترتیب ۳۶٪، ۳۲٪ و ۲۷٪ ایزوله ها نسبت به جتتامایسین، توبرامایسین و آمیکاسین مقاوم گزارش شدند (۷۷). در سایر کشورها، در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۴ توسط Díaz PQ و همکاران در شیلی و بر روی ایزوله های کلبسیلا پنومونیه انجام شد، به ترتیب ۴۷٪ و ۶۵٪ ایزوله ها مقاوم به آمیکاسین و جتتاماسین بودند که این میزان مقاومت بیشتر از مقدار مقاومت یافت شده در مطالعه حاضر است (۸۱). در مطالعه ای که توسط Wang YQ همکاران در سال ۱۹۹۵ بر روی ۳۳۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه در چین انجام شد، ۴۲٪ آن ها به جتتامایسین مقاوم بودند که این مقدار کمتر از میزان مقاومت به این داروها در مطالعه حاضر

است (۸۲). در مطالعه ای که توسط Haldorsen و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی ایزوله های کلبسیلا و اشريشیاکلی در نروژ انجام شد در مجموع ۳۱٪ ایزوله های کلبسیلا مقاوم به جنتامایسین و یا توبرامایسین بودند که این مقدار نیز کمتر از میزان مقاومت به این داروها در مطالعه حاضر است (۸۰). از اینرو بنظر می رسد پیدایش ایزوله های مقاوم به عوامل آنتی باکتریال وسیع الطیف در بخش های بیمارستان های ما با استفاده نادرست و گسترده این آنتی بیوتیک ها مرتبط است.

مطالعه حاضر شیوع سطح بسیار بالایی از مقاومت به آمینوگلیکوزید بواسطه آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزید (AMEs) (۹۴/۲٪) در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جمع آوری شده از چندین بیمارستان آموزشی در ایران را نشان می دهد، که از آن میان (۹۲/۴٪) و (۷۹/۶٪) از نمونه ها به ترتیب حامل ژن های *aac(3)-II* و *aac(6')-Ib* بودند. میزان شیوع مقاومت بواسطه AME در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه حاصل از مطالعه حاضر بالاتر از میزان شیوع گزارش شده توسط Liang و همکارانش از چین ۳۰/۲٪ برای *aac(3)-II* و ۱۹/۸٪ برای *aac(6')-Ib* می باشد (۷۶). در مطالعه ای که توسط Almaghrabi و همکارانش در ایالات متحده آمریکا انجام شد، از ۵۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آمینوگلیکوزید، ۴۹ ایزوله (۹۸٪) حاوی ژن *aac(6')-Ib* و ۱ ایزوله (۲٪) حاوی ژن *ant(2'')-Ia* بودند، که یافته های ما هنوز از این میزان پایین تر است (۷۹). در مجموع مطالعات انجام شده در این زمینه نشان دهنده روند رو به افزایش در میزان مقاومت در برابر آمینوگلیکوزیدها در میان اعضای جنس انتروباکتریاسه باشد.

با توجه به نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر، بیشترین ایزوله های کلبسیلا پنومونیه حاوی ژن های AME، غالبا از بیماران بستری در بخش ICU جمع آوری شده است. بستری شدن طولانی مدت در بخش ICU، مصرف آنتی بیوتیک های وسیع الطیف بدون تجویز پزشک، بیماری زمینه ای مزمن، استفاده از تکنیک های

تهاجمی و دستگاه های پزشکی آلوده بیماران را در معرض خطر عفونت با ایزوله های مقاوم قرار می دهد. در این مطالعه ۱۳۴ (۷۷/۹٪) ایزوله بطور مشترک دارای ژن های *aac(3)-II* و *aac(6')-Ib* بودند. در این در حالی است که ژن های *aac(3)-Ia*، *ant(2'')-Ia* و *ant(4')-IIb* یافت نشدند. پیرایه و همکارانش از ۱۰۸ ایزوله مقاوم به آمینوگلیکوزید ۶۱ (۵۶/۴٪) را حامل ژن های *aac(6')-Ib* و *aac(3)-Ib* (۳۵/۲٪) گزارش کرده اند (۷۷). تحقیقات اینترنتی ما در بین مقالات مبین این است که نتایج فوق تنها گزارشات از مقاومت ایجاد شده در گونه کلبسیلا پنومونیه بوسیله ژن های کدکننده آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها در ایران است. با این وجود، گزارشاتی از شیوع ژن های AME در سایر گونه های باکتریایی وجود دارد. در مطالعه ای در ایران که توسط صمدی و همکارانش انجام شد، میزان ژن های *aac(3)-Ia*، *aac(3)-IIa* و *aac(6')-Ib* به ترتیب (۷۲/۰۴٪)، (۶۶/۷٪) و (۳۶/۶٪) در ایزوله های انتروکوک گزارش شد (۹۲). در مطالعه دیگری از ایران سلیمانی و همکارانش میزان شیوع ژن *aac(3)-IIa* (۷۸/۸۷٪) و *ant(2'')-Ia* (۴۷/۸۸٪) را در بین گونه های اشیریشیا کلی اوروپاتوزنیک، گزارش کردند (۹۳). در مطالعه ای که وزیری و همکارانش در ایران انجام دادند، ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا حامل ژن *aac(6')-II* (۳۶٪)، *ant(2'')-I* (۲۸٪) و *aac(6')-II* (۷٪) بودند (۹۴).

در مطالعه حاضر از آزمون ERIC-PCR به منظور بررسی تایپینگ مولکولی استفاده شد. الگوی باندهای DNA در اکثر ایزوله ها نشان داد که ۵۰٪ نمونه ها دارای الگوی مولکولی مشخصی نبودند، بدین معنا که انتشار ایزوله های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها به دلیل انتشار سویه های خاصی نمی باشد. با توجه به اینکه ایزوله های مورد مطالعه از چندین بیمارستان مختلف و از دو استان متفاوت جمع آوری شدند، نتایج بدست آمده توجیه پذیر است.

نتایج این مطالعات تایید کننده روند رو به افزایش مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و افزایش گسترش ژن های *AME* می باشد. یافته های مطالعه حاضر همچنین نشان دادند که تعداد کمی از ایزوله های فاقد ژن *AME* همچنان دارای مقاومت فنوتیپی به آمینوگلیکوزیدها هستند که مقاومت فوق می تواند به دلیل وجود سایر مکانیسم های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها مانند تغییر *16SrRNA* به واسطه متیلازها و یا وجود پمپ های افلاکس باشد.

۶-۲ نتیجه گیری

یافته های مطالعه حاضر میزان شیوع بالای مقاومت به آمینوگلیکوزید بواسطه ژن های *AME* را در بین ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه در ایران تایید می کند. ظهور و گسترش چنین ارگانیسم های قابل انتقالی در مراکز پزشکی در سراسر کشور باعث نگرانی در مورد سلامتی انسان ها می شود. اطلاعات ما بر ضرورت ایجاد یک استراتژی کنترل عفونت مناسب و درمان آنتی بیوتیکی موثر تاکید دارد، بر همین اساس پزشکان باید در تجویز دارو دقت لازم را داشته باشند و نمونه مورد نظر را برای انجام تست آنتی بیوگرام به آزمایشگاه ارسال کنند تا بهترین گزینه دارویی برای بیمار مورد استفاده قرار گیرد. کارشناسان آزمایشگاه باید بر روی نمونه مورد نظر تست آنتی بیوگرام انجام دهند و در ضمن باید بتوانند مکانیسم های مقاومت به داروها را شناسایی و به پزشکان اطلاع دهند. پرسنل آزمایشگاه و پرستاران و کسانی که با بیماران در بیمارستان در تماس هستند باید برای وجود این ایزوله های مقاوم مورد بررسی قرار گیرند تا در صورتیکه به این باکتریها آلوده هستند، درمان شوند.

فراوانی بالای ژن های *AME* در میان سویه های با اهمیت ، بسیار حائز اهمیت بالینی می باشد. لذا لزوم بررسی های بیشتر با بهره گیری از تکنیک های مولکولی از نظر بررسی کامل الگوی ژنتیکی مقاومت، وجود برنامه های مراقبتی و نظارتی دقیق و اقدامات پیشگیرانه جدی را نشان می دهد.

۳-۶ پیشنهادات

در این مطالعه نظر به میزان مقاومت بالا نسبت به آمینوگلیکوزیدها در این مطالعه، پیشنهاد می شود سایر فاکتورهای دخیل از جمله حضور و نقش متیلازهای تغییردهنده 16srRNA نیز بررسی شود.

تشکر و قدردانی

از شورای مرکزی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و معاونت محترم پژوهشی تقدیر می شود.

فهرست منابع (References)

1. Murray PR, Holmes B, Aucken HM. *Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Serratia*, and other *Enterobacteriaceae*, in: Boriello SP, Murray PR, Funke G. Topley & Wilson's. 10th Edition. London: Hodder Arnold; 2005.1474 -1506.
2. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Enterobacteriaceae*. BAILEY & SCOTT'S DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY,12th Edition. Houston Texas, MOSBY ELSEVIER,2007;323-333.
3. Hsueh CT, Chin JC, Yu YY, Chen HC, Li WC, Shen MC, et al. Genetic analysis of the nitrogen fixation system in *Klebsiella pneumoniae*. Sci Sin.1977;20(6):807-17.
4. Huang H, Gong CS, Tsao GT. Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. Appl Biochem Biotechnol.2002;98-100:687-98.
5. Keynan Y, Rubinstein E. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. Int J Antimicrob Agents.2007;30(5):385-9.
6. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1988;11(4):589-603.
7. Kamlesh J, Radsak K, Mannheim W. Differentiation of the *Oxytocum* group from *Klebsiella* by deoxyribonucleic acid hybridization. Int J Syst Bacteriol.1974;24(4):402-407.
8. Bagley S, Seidler RJ, Brenner DJ.K. *planticola* sp. nov.: a new species of *Enterobacteriaceae* found primarily in nonclinical environments. Curr Microbiol.1981;6(4):105-109.

9. Izard D, Ferragut C, Gavini F, Kersters K, De Ley J, Leclerc H. *Klebsiella terrigena*, a new species from soil and water. Int J Syst Bacteriol.1981; 31(2):116-127
10. Ferragut C, Izard D, Gavini F, Kersters K, De Ley J, Leclerc H. *Klebsiella trevisanii*: a new species from water and soil. Int J Syst Bacteriol.1983; 33(2):133-142.
11. Sakazaki R, Tamura K, Kosako Y, Yoshizaki E. *Klebsiella ornithinolytica* sp. nov., formerly known as ornithine positive *K. oxytoca*. Curr Microbiol. 1989;18(4):201-206.
12. Gavini F, Izard D, Grimont PAD, Beji A, Ageron E, Leclerc H. Priority of *K. planticola* Bagley, Seidler, and Brenner 1982 over *K. trevisanii* Ferragut, Izard, Gavini, Kersters, DeLey, and Leclerc. Int J Syst Bacteriol.1983;36(2):486-488.
13. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with 201 description of *R. ornithinolytica* comb. nov., *R. terrigena* comb. nov. and *R. planticola* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol .2001;51(3): 925-932.
14. Alves MS, Dias RC, De Castro AC, Riley LW, Moreira BM. Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp. J Clin Microbiol. 2006 October;44(10):3640–3646.
15. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompart CM, Albertí S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. Infect Immun.2004;72(12):7107-14.
16. Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, Hansen DS, Von Gottberg A, Mohapatra S, *et al.* Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. Emerg Infect Dis. 2002;8(2):160-6.

17. Brisse S, Grimont F, Grimont P. The Genus *Enterobacter*. Prokaryotes, 3th Edition. Springer, 2006; 159-196
18. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1998;11(4):589-603.
19. Feldman C, Ross S, Mahomed AG, Omar J, Smith C. The aetiology of severe community-acquired pneumonia and its impact on initial, empiric, antimicrobial chemotherapy. Respir Med. 1995;89(3):187-92.
20. Fang FC, Sandler N, Libby SJ. Liver abscess caused by *magA*+ *Klebsiella pneumoniae* in North America. J Clin Microbiol. 2005;43(2):991-2.
21. Lederman ER, Crum NF. Pyogenic liver abscess with a focus on *Klebsiella pneumoniae* as a primary pathogen: an emerging disease with unique clinical characteristics. Am J Gastroenterol. 2005;100(2):322-31.
22. Struve C, Bojer M, Nielsen EM, Hansen DS, Krogfelt KA. Investigation of the putative virulence gene *magA* in a worldwide collection of 495 *Klebsiella* isolates: *magA* is restricted to the gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* capsule serotype K1. J Med Microbiol. 2005;54(Pt 11):1111-3.
23. Rahimian J, Wilson T, Oram V, Holzman RS. Pyogenic liver abscess: recent trends in etiology and mortality. Clin Infect Dis. 2004;39(11):1654-9.
24. Kim JK, Chung DR, Wie SH, Yoo JH, Park SW. Risk factor analysis of invasive liver abscess caused by the K1 serotype *Klebsiella pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28(1):109-11.

25. Seale M, Lee WK, Daffy J, Tan Y, Trost N. Fulminant endogenous *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis: imaging findings. *Emerg Radiol.* 2007;13(4):209-12.
26. Fang CT, Lai SY, Yi WC, Hsueh PR, Liu KL, Chang SC. *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. *Clin Infect Dis.* 2007;45(3):284-93.
27. Nguyen Thi PL, Yassibanda S, Aidara A, Le Bouguénec C, Germani Y. Enteropathogenic *Klebsiella pneumoniae* HIV-infected adults, Africa. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(1):135-7.
28. Arakawa Y, Ohta M, Wacharotayankun R, Mori M, Kido N, Ito H, *et al.* Biosynthesis of *Klebsiella* K2 capsular polysaccharide in *Escherichia coli* HB101 requires the functions of *rmpA* and the chromosomal *cps* gene cluster of the virulent strain *Klebsiella pneumoniae* Chedid (O1:K2). *Infect Immun.* 1991;59(6):2043-50.
29. Cortés G, Borrell N, de Astorza B, Gómez C, Sauleda J, Albertí S. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infect Immun.* 2002;70(5):2583-90.
30. Lin JC, Chang FY, Fung CP, Xu JZ, Cheng HP, Wang JJ, *et al.* High prevalence of phagocytic-resistant capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae* in liver abscess. *Microbes Infect.* 2004;6(13):1191-8.
31. Topley and Wilson's. *Microbiology and Microbial Infections. Bacteriology: Enterobacteriaceae.* 10 th edition. 2006; pp:1476-1483.

32. Campos M.A., Vargas M.A., Regueiro V., Llompart Alberti C.M. and Bengoechea J.A Capsule Polysaccharide Mediates bacterial resistance to Antimicrobial. *Infect Immune* December. 2004;72(12):7107-7114.
33. William P., Lambert P.A. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J.Gen.Microbial*.1983; 129:2181-2191.
34. Roberts I.S., Saunders F.K. Bacterial capsule and interaction with complement and phagocytes. *Biochem. Soc. Trans.*1989; 17:462-464.
35. Ciurana B. and Tomas J.M. Role of polysaccharide and complement in susceptibility of *Klebsiella pneumonia* to nonimmune serum. *Infect.Immune*. 1987. 55;2741:2746.
36. Tomas J.M., Benedi V.J. Role of capsule and O antigen in resistance of *Klebsiella pneumonia* to serum bacterial activity. *Infect. Immune*. 1989. 54;85-89.
37. Evrard B, Balestrino D, Dosgilbert A, Bouya-Gachancard JL, Charbonnel N, Forestier C, et al. Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*. 2010;78(1):210-9.
38. Grimont P.A.D., Grimont F., Genus *Klebsiella* In: Brenner D.J., Krieg N.R,Staley J.T. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology Volume 2: The Proteobacteria, Part B : The Gammaproteobacteria*. New York: Springer-Verlag. 2005; pp: 685-698.
39. Podschun R, Sahly H. Hemagglutinins of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. *Zentralbl Hyg Umweltmed*.1991;191(1):46-52.

40. Haward B.J. and Klass J. Clinical and pathogenic Microbiology, vol. Mosby. Washington DC. 1987.
41. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. Infect Immun. 2009;77(11):5016-24.
42. Bortz DM, Jackson TL, Taylor KA, Thompson AP, Younger JG. *Klebsiella pneumoniae* flocculation dynamics. Bull Math Biol. 2008;70(3):745-68.
43. Murray P.R. Manual of Clinical Microbiology. 8ed, vol.1. ASM Press, Washington Dc. 2003.
44. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. J Endotoxin Res. 2001;7(3):167-202.
45. Nassif X. and sansonetti P.J. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumonia* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. Infect. Immun. 1986; 54:603-608.
46. Joppa B., Li S., Cole S. and Gallagher S. Pulsed-Field Electrophoresis for Separation of Large DNA. 2006;1-7.
47. Johnson A.P., Wienbern M.J. Outbreaks of infection in two UK hospital caused by a strain of *Klebsiella pneumonia* resistant to cefotaxime and ceftazidime. J. Hosp. Infect. 1992; 20:97-103.
48. Pfaller M A. Molecular epidemiology in the care of patients. Arch Pathol. Lab Med. 1999; (123):1007-1010.

49. Gierczynski R., Jagielski M., Rastawicki W. and Kaluzewski S. Multiplex-PCR Assay for Identification of *Klebsiella pneumonia* Isolates Carrying the cps Loci for k1 and k2 Capsule Biosynthesis. *Journal of Microbiology*. 2007; 56(3);153-156.
50. Yu W.L., Fung C.P., Ko W.C., Chang K.C., Lee C.C. Polymerase Chain Reaction Analysis for Detection capsule serotypes k1 and k2 *Klebsiella pneumonia* Causing Abscesses of the Liver and Other Sites. *The Journal of Infectious disease*. 2007; 195: 1235-6.
51. Turton J.F., Englender H., Gabriel S.N., Turton S.E., Kaufmann M.E., Pitt T.L. Genetically similar isolates of serotype K1 causing liver abscesses in three continents. *Journal of Medical Microbiology*. 2007;56:593-597.
52. Balfanz J., Rautenberg P. and Ullmann U. Molecular mechanisms of action of bacterial exotoxins. *Zentralbl Bakteriologie*. 1996; 284:170-206.
53. Buffenmeyer C.L., Ruchek R.R. Bacteriocin (Klebsiocin) sensitivity typing of *Klebsiella*. *J. Clin. Microbiol.* 1976; 4:239-244.
54. Coovadia Y.M., Johnson A.P. Multiresistant *Klebsiella pneumonia* in a neonatal nursery: the importance of maintenance of infection control policies and procedures in the prevention of outbreaks. *J. Hosp. Infect.* 1992; 20:197-205.
55. "Genotyping definition". NIH. Retrieved 2011;09-21.
56. Speert D P. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Biosci.* 2002; (7):354-61.

57. Foley L, Lynne M A, Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect. Genet. Evol.* 2009; (9):430-440.
58. Wu F, la-Latta P. Molecular typing strategies. *Semin. Perinatol.* 2002;(26):357-366.
59. Friedman, M. and G. W. Friedland. 1998. Fleming and Antibiotics, p. 168-191. In *Medicine's 10 greatest discoveries*. Yale University Press New Haven & London.
60. Khardori, N. 2006. Antibiotics-past, present, and future. *Med. Clin. North Am.* 90:1049-1076.
61. Walsh, C. 2010. Antibiotics: Initial Concepts, p. 3-9. In *Antibiotics: Actions, origins and resistance*. ASM Press.
62. Mims, C., H. M. Dockrell, R. V. Goering, I. Roitt, D. Wakelin, and M. Zuckerman. 2004. *Medical Microbiology*. Elsevier.
63. Tenover, F. C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Infect. Control* 34:S3-10.
64. Arya, D. P. 2007. Aminoglycoside antibiotics. From chemical biology to drug discovery. Wiley-Interscience.
65. Ramirez, M. S. and M. E. Tolmasky. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat.* 13:151-171.
66. Walsh, C. 2003. Antibiotics: actions, origins, resistance. ASM Press.
67. Isoherranen, N. and S. Soback. 2000. Determination of gentamicins C(1), C(1a), and C(2) in plasma and urine by HPLC. *Clin. Chem.* 46:837-842.
68. Vakulenko, S. B. and S. Mobashery. 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:430-450.
69. Snyder, L. and W. Champness. 2007. *Molecular genetics of bacteria*. ASM Press.

70. Cambray, G., A. M. Guerout, and D. Mazel. 2010. Integrons. *Annu. Rev. Genet.* 44:141-166.
71. Houghton, J. L., K. D. Green, W. Chen, and S. Garneau-Tsodikova. 2010. The future of aminoglycosides: The end or renaissance? *Chembiochem.* 11:880-902.
72. Shaw, K. J., P. N. Rather, R. S. Hare, and G. H. Miller. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57:138-163.
73. Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C. H. Park, K. Bush, and D.C. Hooper. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* 12:83-88.
74. Sunada, A., M. Nakajima, Y. Ikeda, S. Kondo, and K. Hotta. 1999. Enzymatic 1-N-acetylation of paromomycin by an actinomycete strain #8 with multiple aminoglycoside resistance and paromomycin sensitivity. *J. Antibiot. (Tokyo)* 52:809-814.
75. Fereshteh Eftekhari, Seyed Mohsen Seyedpour. Prevalence of qnr and aac(6')-Ib-cr Genes in Clinical Isolates of *Klebsiella Pneumoniae* from Imam Hussein Hospital in Tehran. *Iran J Med Sci* November 2015;40(6).
76. Liang et al. Molecular epidemiology of aminoglycosides resistance on *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in China. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(1):1381-1385.
77. Peerayeh SN1, Rostami E2, Siadat SD3, Derakhshan S. High rate of aminoglycoside resistance in CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Tehran, Iran. *Lab Med.* 2014 Summer;45(3):231-7.

78. Chaudhary M, Payasi . Resistance patterns and prevalence of the aminoglycoside modifying enzymes in clinical isolates of gram negative pathogens. *Global Journal of Pharmacology.* , 2014; 8 (1): 73-79.
79. Almaghrabi et al. Plazomicin against Carbapenem-Resistant *K. pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(8):4443-4451.
80. Haldorsen BC, Simonsen GS, Sundsfjord A, Samuelsen O. Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II and AAC(6')-Ib. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014 Jan;78(1):66-9.
81. Díaz PQ, Bello HT, Domínguez MY, Trabal NF, Mella SM, Zemelman RZ, González GR. Resistance to gentamicin, amikacin and ciprofloxacin among nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* subspecies pneumoniae producing extended spectrum beta-lactamases. *Rev Med Chil*. 2004 Oct;132(10):1173-8.
82. Wang YQ, Wang F, Zhu DM. Bacterial resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 1995, 75(2):88-91.
83. Smith JL, Drum DJ, Dai Y, Kim JM, Sanchez S, Maurer JJ, Hofacre CL, Lee MD. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Mar;73(5):1404-14.
84. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med*. 2012;27(2):128-142.
85. Lu PL, Liu YC, Toh HS, et al. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in the Asia-

- Pacific region: 2009-2010 results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 40 Suppl:S37-43.
86. Karbasizadeh V, Badami N, Emtiazi G. Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. *Afr J Biotech*. 2003; 2(10):379-83.
 87. Chen LF, Chopra T, Kaye KS. Pathogens resistant to antibacterial agents. *Infect Dis Clin North Am*. 2009; 23(4):817-845.
 88. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(6):1119-1125.
 89. Gootz TD. The global problem of antibiotic resistance. *Crit Rev Immunol*. 2010; 30(1):79-93.
 90. Wang A, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, Ding H, Deng Q, Wang L, Shen X. Occurrence of qnr-positive clinical isolates in *Klebsiella pneumoniae* producing ESBL or AmpC type beta-lactamase from five pediatric hospitals in China. *FEMS Microbiol. Lett* 2008;283(1):112-116.
 91. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(4): 727–37.
 92. Nasser samadi , iraj pakzad , alireza monadi sefidan , hasan hosainzadegan , asghar tanomand. Study of aminoglycoside resistance genes in *Enterococcus* and *Salmonella* strains isolated from ilam and milad hospitals, iran. *Jundishapur j microbiol*. 2015 april; 8(4): e18102.

93. Soleimani et al. Frequency distribution of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes in uropathogenic *E. coli* isolated from Iranian hospital. BMC Research Notes. 2014; 7:842.
94. Vaziri F et al. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. CLINICS 2011;66(9):1519-1522.

ضمیمه

ضمیمه ۱

تهیه نیم مک فارلند: استاندارد نیم مک فارلند سولفات باریوم به روش زیر تهیه می شود :

(۱) ۰/۵ میلی لیتراز کلرور باریوم (BaCl_2) ۰/۰۴۸ mol/l ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ۱/۱۷۵ W/V) رابه ۹۹/۵ میلی لیتر

اسید سولفوریک ۰/۱۸ mol/l (۱٪ V/V) اضافه کنید و با همزدن مداوم سوسپانسیون بدست آورید.

(۲) چگالی صحیح کدورت استاندارد با استفاده از اندازه گیری جذب در اسپکتروفتومتر با طول مسیر نوری ۱

سانتی متر، مشخص شود. جذب در ۶۲۵ نانومتر باید بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ باشد.

(۳) سوسپانسیون سولفات باریوم باید به مقدار ۴-۶ ml در لوله های در پیچ دار هم اندازه با لوله های سوسپانسیون باکتریایی ریخته شود.

(۴) درب این لوله ها باید محکم بسته شوند و در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری گردند.

(۵) استاندارد سولفات باریوم قبل از هر بار استفاده باید به شدت (ترجیحا با ورتکس مکانیکی) همزده شود، تا کدورت یکنواختی ایجاد گردد. در صورت مشاهده ذرات بزرگ ، باید استاندارد تازه ای تهیه گردد .

(۶) استاندارد سولفات باریوم باید به صورت ماهانه جایگزین شود یا جذب آن اندازه گیری گردد.

ضمیمه ۲

TBE بافر: ۵۴ گرم تریس را با ۲۷/۵ گرم بوریک اسید در ۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل کرده سپس ۲۰

میلی لیتر EDTA (۰/۵ مولار) به آن اضافه کرده و حجم را به یک لیتر می رسانیم.

ضمیمه ۳

EDTA (۰/۵ مولار) : ۱۸/۱۶ گرم EDTA در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل کرده و PH را با استفاده از

NaOH به ۸ رسانده و سپس توسط اتوکلاو استریل می گردد.

**Prevalence of aminoglycoside modifying enzymes genes (AMEs) in
aminoglycoside-resistant *K. pneumonia* isolates from Qazvin and Tehran provinces, Iran**

Peymani A¹, Nasiri G²

- 1- Associate professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Iran.
- 2- MSc Student, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Iran.

Corresponding author: Dr Amir Peymani, Department of Microbiology, Qazvin University of Medical Sciences, Iran, e-mail: a.peymani@gmail.com

Abstract

Background: *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) is one of the most common causes of nosocomial infections such as pneumonia, urinary tract infections, septicemia and wound infections. Aminoglycosides are a group of antibiotics that have been widely used in the treatment of infections caused by Gram-negative bacteria. Aminoglycoside-modifying enzymes are particularly leading to high-level resistance against aminoglycosides among gram-negative pathogens including *K. pneumoniae*.

Objectives: This study aimed to determine the frequency of aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) genes in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from clinical samples by PCR, and evaluate the genetic relations of isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR.

Materials and Methods: A total of 266 *Klebsiella pneumoniae* isolates were collected from hospitals of Qazvin and Tehran, Iran. The identification of isolates was done by standard laboratory methods. Aminoglycosides susceptibility tests were done by Kirby-Bauer method for screening of aminoglycoside-resistant isolates according to the CLSI guideline. MICs for Gentamicin were determined by agar dilution method. PCR amplification were applied to detect the presence of aminoglycoside modifying enzymes genes (*aac(6')-Ib*, *aac(3)-II*, *aac(3)-Ia*, *ant(2'')-Ia*, *ant(4')-IIb*) by using special primers and positive controls. All positive AMEs strain were analyzed for clonality by ERIC-PCR.

Results: 172 (64.6%) out of 266 *K. pneumoniae* isolates, were non-susceptible to aminoglycoside compounds, among those 179 (70.5%) and 82 (32.2%) isolates showed high and low-level of aminoglycoside-resistance against kanamycin and amikacin, respectively. MICs results demonstrated high rate of 88.0% for Gentamicin. Of 172 aminoglycoside non-susceptible isolates, 159(92%) isolates were positive for presence of *aac(6')-Ib* as the most dominant gene which followed by *aac(3)-II* 137(80%) either alone or in combination . All of the

non-susceptible isolates were negative for all *aac(3)-Ia*, *ant(2'')-Ia*, and *ant(4')-IIb* genes. ERIC-PCR analyzing, demonstrated that 50% of positive strains showed Different DNA banding patterns as independent genotype which followed by three distinct clones including A (26.2%), B (14%), and C (9.9%). These findings confirmed that most of the isolates were not clonally related.

Conclusions: Our results, revealed high prevalence of aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) among the clinical isolates of *K. pneumonia* in two provinces of Iran. So, to prevent further limitation in treatment of patients with these infections, more suitable and applicable strategies in treatment and administration of antibiotics in our healthcare systems are needed.

Key Words: *Klebsiella pneumoniae*, Aminoglycoside Modifying Enzymes, Antibiotic Resistance, ERIC-PCR



Qazvin University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

Thesis submitted for

Master of Science degree in medical microbiology

Title:

Prevalence of aminoglycoside modifying enzymes genes (AMEs) in aminoglycoside-resistant *K. pneumonia* isolates from Qazvin and Tehran provinces, Iran

Supervisor: Dr.Amir Peymani

Advisor: Dr.Amir Javadi

By:Gelareh Nasiri

Year of graduation:

Registration number: